

# Bedeutung der Steroidbiosyntheseenzyme für die adrenale Funktion Frühgeborener in Abhängigkeit vom Gestationsalter

---

**LARS KÄSTNER**

**INAUGURALDISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Bedeutung der Steroidbiosyntheseenzyme  
für die adrenale Funktion Frühgeborener  
in Abhängigkeit vom Gestationsalter**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Lars Kästner**

aus Arnstadt

Gießen 2011

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin,  
Abteilung für Allgemeinpädiatrie und Neonatologie  
Leitung: Prof. Dr. med. K.-P. Zimmer  
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. M. Heckmann

Gutachter: Prof. Dr. med. T. Linn

Tag der Disputation: 11.12.2012

## **Erklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Lars Kästner

# Inhaltsverzeichnis

<b>1) Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1) Die Nebennieren	6
1.2) Die Entwicklung und Funktion der fetalen NNR	7
1.3) Die fetoplazentare Einheit	10
1.4) Die postnatale Adaption	12
<b>2) Ziele der Studie</b>	<b>15</b>
2.1) Beschreibung des Patientenkollektivs	15
2.2) Enzymaktivität durch Quotientenbildung der Urinmetabolite	15
2.3) Verlauf der Enzymaktivitäten abhängig vom Gestationsalter	15
2.4) Mögliche Einflussfaktoren	16
<b>3) Patienten und Methoden</b>	<b>17</b>
3.1) Patienten	17
3.1.1) <i>Patientenkollektiv</i>	17
3.1.2) <i>Ausschlusskriterien</i>	17
3.1.3.) <i>Gruppenbildung</i>	18
3.2) Methoden	20
3.2.1) <i>Uringewinnung</i>	20
3.2.2) <i>Labordiagnostik mittels quantitativer GC-Massenspektrometrie</i>	22
3.2.3) <i>Berechnung der Enzymaktivitäten</i>	23
3.2.4) <i>Patientendaten</i>	25
3.2.5) <i>Statistik</i>	26
3.2.6) <i>Ethische Evaluation</i>	28
<b>4) Ergebnisse</b>	<b>29</b>
4.1) Beschreibung des Patientenkollektivs	29
4.2) Verlauf der Enzymaktivitäten abhängig vom Gestationsalter	33

4.3) Einfluss von Erkrankung auf die Enzymaktivität	46
<b>5) Diskussion</b>	<b>47</b>
5.1) Patientenkollektiv	47
5.2) Methodik	48
5.2.1) <i>Uringewinnung</i>	48
5.2.2) <i>Quotientenbildung</i>	48
5.3) Verlauf der Enzymaktivitäten abhängig vom Gestationsalter	49
5.4) Einfluss von Erkrankung auf die Enzymaktivität	54
5.5) Limitationen der Untersuchung	56
5.6) Fazit	56
<b>6) Zusammenfassung</b>	<b>58</b>
<b>7) Summary</b>	<b>60</b>
 <b>Anhang</b>	 <b>62</b>
1) Harnsteroid bei Frühgeborenen und Neonaten	62
2) Formeln zur Berechnung der Enzymaktivität	63
3) Verzeichnis der im Text vorkommenden Abkürzungen	63
4) Zusammenfassung der dreifaktoriellen Varianzanalyse	64
Elterninformation	65
Einverständniserklärung	66
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>Danksagung</b>	<b>71</b>





## **1) Einleitung**

### **1.1) Die Nebennieren**

Die paarig angelegte Nebenniere spielt im menschlichen Organismus eine zentrale Rolle. In ihr sind zwei endokrine Drüsen unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft zu einem einzigen Organ zusammengefasst.

Das innen liegende Nebennierenmark (Medulla) entsteht aus den neuroektodermalen Sympathikogonien [1], diese durchwandern ab dem 45. Tag der Embryonalentwicklung die Anlage der Nebennierenrinde und bilden im Innern das Mark [2]. Die Zellen des Parenchyms bestehen zum größten Teil aus chromaffinen und phäochromen Zellen, deren Granula die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin enthalten und freisetzen. Diese Hormone sind Bestandteil des vegetativen Nervensystems und steuern verschiedene Körperfunktionen (z.B. Herzfrequenz, Blutdruck, Verdauung).

Die außen liegende Nebennierenrinde (NNR, Cortex) entwickelt sich in der 4. Embryonalwoche aus dem Zölomepithel der hinteren Leibeswand [1]. Die adulte Rinde ist dreizonig aufgebaut. Die außen gelegene Zona glomerulosa produziert hauptsächlich Aldosteron und andere Mineralocorticoide. Die mittig gelegene Zona fasciculata, die ca. 70 % der NNR ausmacht sezerniert v.a. Cortisol und andere Glucocorticoide. Die innen gelegene Zona reticularis ist für die Bereitstellung der Androgene (Testosteron, Östrogen) verantwortlich [3]. Damit ist die NNR ein lebenswichtiges Organ, welches Einfluss auf den Elektrolythaushalt, auf den Kohlenhydrat – und Eiweißstoffwechsel, auf das Immunsystem und auf die Sexualentwicklung hat.

Das Gewicht der adulten Nebenniere beträgt ca. jeweils 4 g, wobei ca. 80 % des Gewichtes auf die Nebennierenrinde fallen.

## 1.2) Die Entwicklung und Funktion der fetalen NNR

Im Folgenden soll speziell auf die Entwicklung der Nebennierenrinde eingegangen werden.

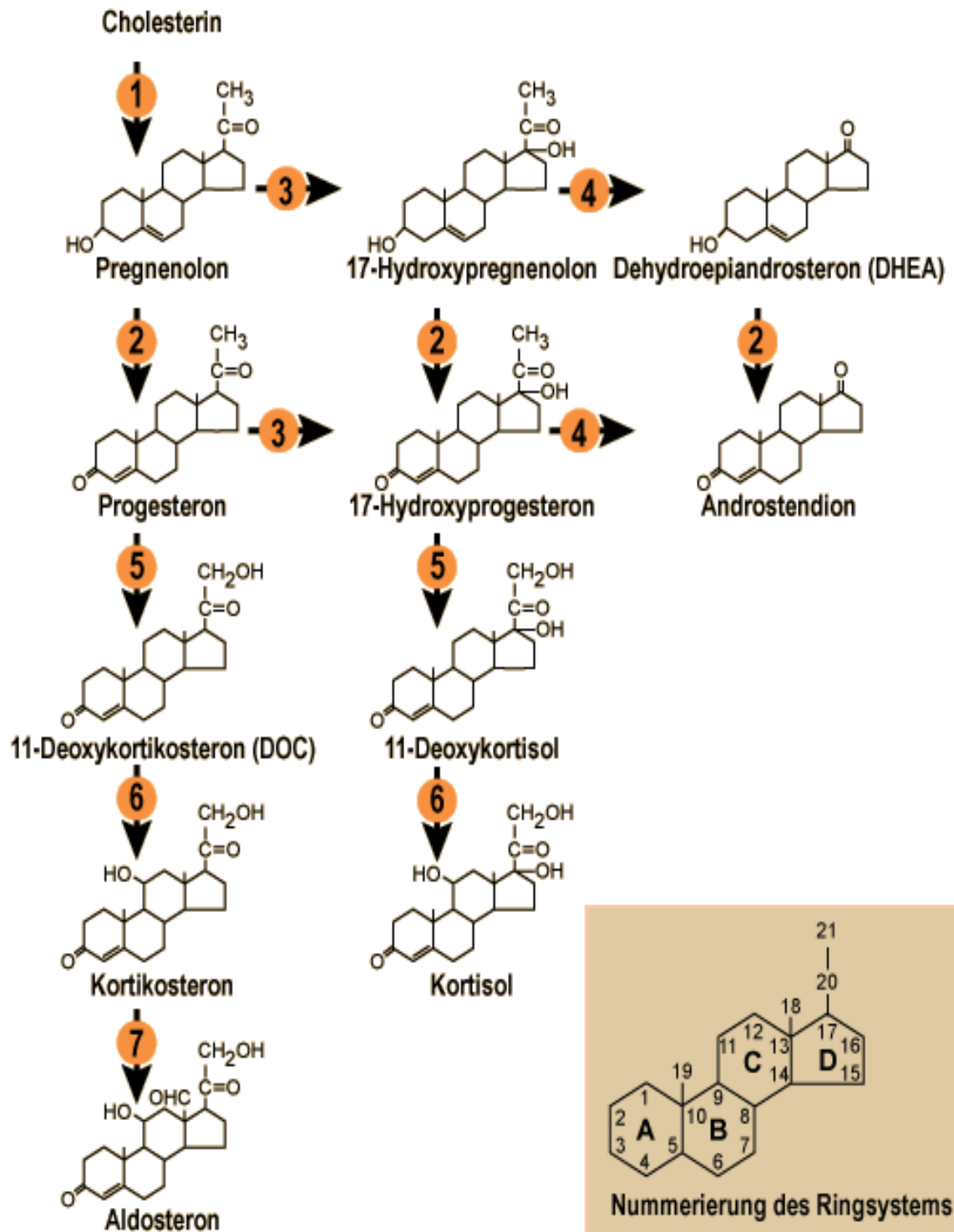
Im Rahmen der Fetalentwicklung kommt es zu einem raschen Gewichtsanstieg. Bereits im 4. Monat wiegen beide Nebennieren ca. 4 g/kg KG und haben damit ihr höchstes relatives Gewicht, welches etwa 35 mal höher ist als das des Erwachsenen, erreicht [4]. Den überwiegenden Anteil hat dabei die Nebennierenrinde.

*Sucheston* und *Cannon*, [5], beschrieben bereits 1968 fünf verschiedene Entwicklungsstufen in der zonalen Differenzierung der NNR. Beginnend mit der Kondensation, Proliferation und Migration der Zellen des Zölomepitels (3. – 6. Gestationswoche), über die Differenzierung des fetalen Cortex in zwei verschiedene Zonen (8. – 10. Gestationswoche) bis zur postnatalen Atrophie des Fetocortex und Zonierung der adulten Nebenniere.

Nach der 10. – 12. Gestationswoche bleibt die Histologie der fetalen Nebennierenrinde nahezu gleich. Der sogenannte Fetocortex (oder Fetalzone), der ca. 80 – 90 % der NNR darstellt, besteht aus großen eosinophilen Zellen, die Eigenschaften steroidproduzierender Zellen besitzen. Der Neocortex (definitive, adulte oder permanente Zone) besteht aus einem schmalen Saum engliegender Basophiler mit den Eigenschaften proliferierender Zellen. Außerdem besteht eine Übergangszone.

Auch funktionell unterscheiden sich die verschiedenen Zonen der fetalen Nebennierenrinde.

Abb.1: Steroidbiosynthese



- 2) 3 $\beta$ -HSD    5) 21HYD  
 3) 17HYD    6) 11BHYD

Dabei kommt den beiden Schlüsselenzymen der Steroidsynthese, der 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) und der 17 $\alpha$ -Hydroxylase (17HYD), eine besondere Bedeutung zu (siehe Abb.1). Beide Enzyme müssen zur Synthese von Aldosteron und Cortisol zur Verfügung stehen. Wird die 3 $\beta$ -HSD nicht exprimiert, können lediglich Dehydroepiandrosteron (DHEA) und im Weiteren Androgene synthetisiert werden. Wird 17HYD nicht exprimiert, können nur Mineralocorticoide gebildet werden.

Die 3 $\beta$ -HSD wird während der Schwangerschaft im Fetocortex nicht gebildet. Eine Bildung von Mineralo – und Corticosteroiden ist entsprechend dort nicht möglich, es entstehen DHEAS. Im Neocortex und zumindest in der Spätschwangerschaft auch in der Übergangszone kann dagegen eine 3 $\beta$ -HSD Aktivität nachgewiesen werden [6, 7].

Die 17HYD wird im Fetocortex und in der Übergangszone exprimiert, fehlt aber im Neocortex. Somit werden in der Übergangszone alle Enzyme gebildet, folglich ist nur dort eine Cortisolsynthese de novo möglich [8].

Die 21-Hydroxylase (21HYD), dessen Mangel das klassische Adrenogenitale Syndrom (AGS) mit Cortisol- und Mineralocorticoidmangel darstellt, katalysiert die Synthese der Progesterone zu den Desoxycortisolen. Das klinische Vollbild eines AGS manifestiert sich in Hypoglykämie, arterieller Hypotonie, u.U. lebensbedrohlichen Elektrolytverschiebungen und Virilisierung des weiblichen Geschlechts. Bei Frühgeborenen finden sich im Vergleich zu reifen Neugeborenen höhere 17-OH-Progesteronkonzentrationen, was durch eine verminderte Aktivität der 21-Hydroxylase erklärt werden könnte.

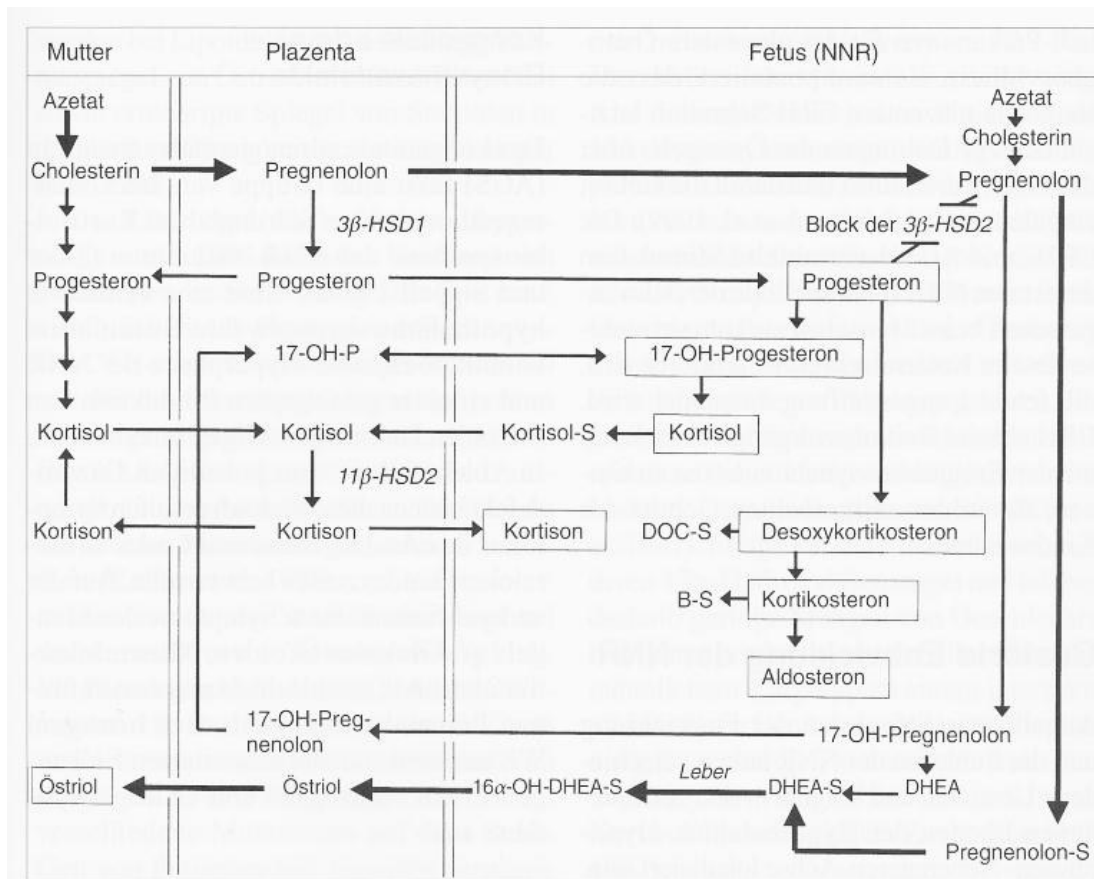
Die 11 $\beta$ -Hydroxylase (11 $\beta$ -HYD) katalysiert den letzten Schritt zur Cortisolbiosynthese. *Hingre et al* [9] konnten in ihrer Arbeit eine reduzierte Enzymaktivität bei Frühgeborenen < 30 SSW in den ersten Lebenstagen im Vergleich zu reifen Neugeborenen nachweisen. Dabei wurden die basalen 11-Desoxycortisol - und Cortisol - Level bestimmt und die jeweiligen Substrat / Produkt – Ratios bei Früh – und Reifgeborenen verglichen. Es fand sich eine signifikant erhöhte Ratio (11,9 +/- 2,2 vs. 2,1 +/- 0,4; p < 0,001), d.h. verminderte Enzymaktivität, bei den Frühgeborenen.

Auf welchen Wegen produziert also der Fetus die für die intrauterine Homöostase und Reifung fetaler Organsysteme wichtigen Mineralo – und v.a. Corticosteroide?

### 1.3) Die fetoplazentare Einheit

Intrauterin ist der Stoffwechsel des Fetus über die Plazenta eng verknüpft mit dem mütterlichen Organismus. Dieses einmalige Zusammenspiel wird als fetoplazentare Einheit zusammengefasst [10]. Eine schematische Darstellung zeigt Abb. 2 im Folgenden.

### Abb.2: Die fetoplazentare Einheit

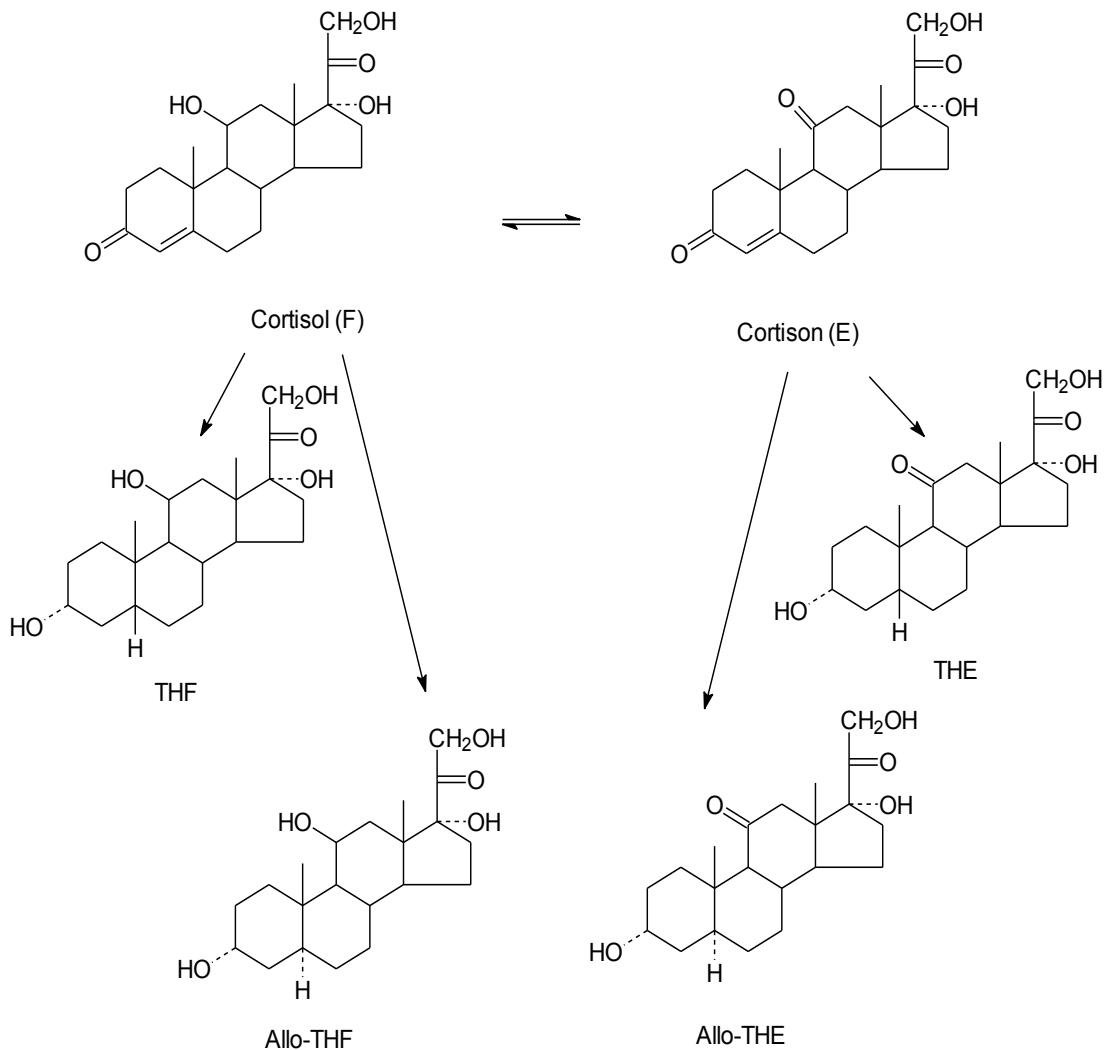


Auf der einen Seite stellt das vom Fetocortex ca. ab der 8. SSW produzierte DHEA bzw. das in der fetalen Leber hydroxylierte  $16\alpha$ -OH-DHEAS das wichtigste Substrat der mütterlichen Östriolsynthese dar. Sowohl mütterlicher Östriolspiegel als auch die Sekretionsrate des DHEAS im Fetocortex steigen gleichsam bis zur Geburt an [11] und stellen nicht zuletzt einen Indikator für eine funktionierende Einheit und „Wohlbefinden“ des Fetus dar.

Auf der anderen Seite stellt die Mutter über die Plazenta dem Fetus Progesteron zur Synthese von Cortisol zur Verfügung. So wird der Mangel an 3 $\beta$ -HSD in der Fetalzone umgangen. Das anfallende 17 $\alpha$ -Hydroxy-Pregnenolon wird wiederum in DHEA umgewandelt und der mütterlichen Östriolsynthese zur Verfügung gestellt. Untersu-

chungen zur Expression von Schlüsselenzymen der Cortisolbiosynthese lassen vermuten, dass die menschliche Nebennierenrinde Cortisol aus Cholesterol de novo nicht vor der 30. Gestationswoche produziert, sondern das dazu Progesteron als Vorstufe genutzt wird [8].

Abb.3: Cortisolkatabolismus



Die placentare 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD) liegt in zwei Isoformen vor. Während die 11 $\beta$ -HSD Typ I (v.a. in der Leber vorkommend) Cortison in Cortisol umwandelt, katalysiert die 11 $\beta$ -HSD Typ II (v.a. in der Niere exprimiert) die Inaktivierung des Cortisols in das biologisch inaktive Cortison (siehe Abb. 3). Das Verhältnis aktiver Cortisol-(11-Hydroxy)-Metabolite zu inaktiven Cortison-(11-Keto)-Metaboliten ist ein Maß für die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD. Cortisol ist für die Entwicklung zahlreicher Organsysteme von Bedeutung, z.B. der Leber, der Lunge und des Zentralen Nerven-

systems. Außerdem stellt es einen Inhibitor der ACTH -Sekretion dar und verhindert somit eine Überproduktion von Androgenen [12]. Cortisol ist somit auch für die normale Geschlechtsentwicklung, v.a. der Mädchen, von entscheidender Bedeutung [13]. In hohen Dosen kann es dem Fetus jedoch auch schaden [14]. Intrauterin wird daher Cortisol zu 80% durch die plazentare 11 $\beta$ -HSD inaktiviert [15].

#### **1.4) Die postnatale Adaption**

Zum Zeitpunkt der Geburt werden diese fein aufeinander abgestimmten Stoffwechselwege zwischen Mutter und Fetus abrupt beendet. Eine funktionierende Hypothalamus – Hypophysen – NNR – Achse ist für das extrauterine Leben unabdingbar [16].

Bei reifen Neugeborenen kommt es in den ersten Wochen nach der Geburt zu einer raschen Involution des Fetocortex, die Nebenniere verliert ca. 40 % an Gewicht. Die Plasmakonzentrationen von DHEAS und Ausscheidungsraten von 3 $\beta$ -Hydroxy-5-en-Steroide im Urin nehmen rapide ab [17]. Auf der anderen Seite übernimmt der Necortex, also die definitive Zone, die Bereitstellung signifikanter Mengen an biologisch aktiven Corticosteroiden [18]. *Sasaki et al* [19] untersuchten den Verlauf der Plasmaspiegel von CRH (Corticotropin-Releasing-Hormon) in mütterlichen - und Nabelvenenblut während der Schwangerschaft und unter der Geburt. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg im letzten Schwangerschaftstrimenon mit einem Maximum um die Geburt und einem anschließenden Rückgang. Erhöhte Werte für ACTH im Nabelschnurblut unter der Geburt als Zeichen einer „Stresssituation“ für den Säugling konnten auch *Pohjavuori et al* [20] nachweisen. Nach einem postnatalen „Corticosteroid-Dip“ bis 12 h nach der Geburt steigen die Cortisolkonzentrationen im Plasma beim Säugling wieder an [21]. Ca. ab dem 5. Lebenstag kann ACTH die Cortisolproduktion adäquat stimulieren.[21] Eine typische zirkadiane Rhythmik wird erst nach 3 – 6 Monaten beobachtet [22, 23].

Der Fetus wächst intrauterin in einem Milieu niedriger Cortisolkonzentrationen heran, da wie weiter oben schon erwähnt, das Cortisol zu 80% inaktiviert wird. Die zu frühe Geburt verhindert eine Vorbereitung des Stresshormonsystems wie beim reifen Neugeborenen. Das Frühgeborene wird zudem einem weit höheren Krankheitsstress ausgesetzt. Es befindet sich in einem Dilemma zwischen der Bereitstellung ausreichender Stresshormone und der Weiterreifung seiner Organsysteme in einem völlig anderen Milieuoptymum (siehe Abb.4).

## Regulation des Stresshormons Cortisol – Ein Dilemma des Frühgeborenen?

### **Intrauterin:**

**Aufgabe:** Förderung  
Organreifung

**Produktion:** Wie  
Erwachsener

**Regulation:** Zu 80%  
Inaktivierung

**Cortisolspiegel:** 25-  
50nmol/l

### **Postnatal:**

**Aufgabe1:**  
Stressbewältigung

**Aufgabe 2:** Förderung  
der Organreifung

**Produktion (basal):** Wie  
Erwachsener (Heckmann et al  
2005)

**Regulation (reifes NG):**  
Anstieg von ACTH, CRH  
und Reduktion der  
Inaktivierung

Die aktuelle Datenlage bezüglich der postnatalen, stressbedingten Cortisolausschüttung bei Frühgeborenen zeigt dazu unterschiedliche Ergebnisse. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Frühgeborene auf Stress (z.B. Krankheit, Operationen) nicht mit einer gesteigerten Corticosteroidausschüttung wie bei Erwachsenen reagierten. So wurden z.B. in der Studie von *Scott et al* [24] Frühgeborene mit einem Gestationsalter von 32 bis 35 SSW untersucht. Es zeigten sich signifikant niedrigere Plasmacortisolspiegel bei den kränkeren Kindern. Auch *Heckmann et al* [25] konnten mittels aufwändiger Untersuchungen und Gaschromatografie-Massenspektrometrie (GC-MS) keinen Einfluss der Schwere einer Erkrankung auf die Cortisolproduktionsraten bei Frühgeborenen < 30 SSW nachweisen. Sehr unreife Frühgeborene (< 1000 g Geburtsgewicht) zeigten niedrigere postnatale Cortisolkonzentrationen, aber höhere Spiegel für Steroidvorstufen [9]. In einer anderen Arbeit wurden direkt postnatal i.R. katecholaminpflichtiger arterieller Hypotension auffallend niedrige Cortisolwerte gemessen [26]. Eine Unreife adrener Enzymsysteme wird angenommen [27]. Diese



These wird dadurch unterstützt, dass nach Gabe von Glucocorticoiden die Symptome einer NNR – Insuffizienz verschwanden [28]. Die Unreife der adrenalen Funktion bei Frühgeborenen ist umso ausgeprägter, desto früher die Geburt erfolgt.

Bei reiferen Frühgeborenen > 30 SSW konnten z.B. *Economou et al* [29] höhere Cortisollevel bei kranken Frühgeborenen im Vgl. zu gesunden Frühgeborenen bzw. Reifgeborenen beobachten. *Gunes et al* [30] bestätigten diese Ergebnisse, indem sie höhere Cortisolspiegel bei Frühgeborenen mit RDS (respiratory distress syndrome) als bei denen ohne RDS messen konnten. *Grofer et al* [31] konnten in einer Untersuchung von Frühgeborenen > 30 SSW ebenfalls eine positive Korrelation von Krankheit und Cortisolproduktionsrate mittels GC-MS nachweisen.

Während also bei unreifen Frühgeborenen < 30 SSW kein Zusammenhang zwischen Krankheitsstress und Cortisolproduktion vorliegt, fand sich bei Frühgeborenen > 30 SSW eine Reifung der adrenalen Stressantwort.

Auch die extrauterine Involution der Fetalzone ist abhängig von der Reife bzw. dem postmenstruellen Alter und nicht vom Tag der Geburt. Die DHEAS Konzentration im Plasma und die Ausscheidung der 3 $\beta$ -Hydroxy-5-en-Steroide über den Urin nähern sich erst bei Erreichen eines postmenstruellen Alters von 40 Wochen dem Niveau reifer Neugeborener [32, 33].

## **2) Ziele der Studie**

### **2.1) Beschreibung des Patientenkollektives**

Bereits in vorangegangenen Arbeiten wurden die Steroidmetabolite im Urin Frühgeborener longitudinal erfasst und die summierten Cortisolproduktionsraten sowie Fetozonensteroiden als Marker der adrenalen Funktion bestimmt [31, 34]. Nachdem diese Arbeiten jeweils Frühgeborene < 30 SSW und > 30 SSW getrennt voneinander untersuchte, steht nun das Kollektiv, welches das gesamte Spektrum der Frühgeburtlichkeit von 23-36 Gestationswochen umfasst, zur Verfügung.

### **2.2) Bestimmung der Aktivität der Schlüsselenzyme der fetoplazentaren Einheit durch Quotientenbildung der Steroidmetabolite im Urin**

Die Gaschromatografie-Massenspektrometrie erlaubt die nicht selektive Messung des Steroidmetaboloms in einem Messvorgang. Sie wird in der klinischen Routine u.a. zur Diagnostik von Steroidbiosynthesedefekten im Rahmen eines adrenogenitalen Syndroms eingesetzt. Daher sind zur Charakterisierung der Steroidbiosynthese Substrat-Produkt-Quotienten etabliert [35].

Im Einzelnen werden in dieser Arbeit folgende Enzyme untersucht (siehe Abb.1 und Abb.2):

- 3 $\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase (3 $\beta$ HSD)
- 17 $\alpha$ -Hydroxylase (17HYD)
- 21-Hydroxylase (21HYD)
- 11 $\beta$ -Hydroxylase (11 $\beta$ HYD)
- 11 $\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase (11 $\beta$ HSD)

### **2.3) Longitudinaler Verlauf der Enzymaktivitäten in Abhängigkeit vom Gestationsalter**

Es soll untersucht werden, wie sich die Enzymaktivitäten nach zu früher Geburt und Auflösung der fetoplazentaren Einheit ändern. Der Einfluss des Gestationsalters als der wichtigste Einflussfaktor bei Frühgeborenen soll dabei analysiert werden. Dazu wurden in einem ersten Schritt die individuellen grafischen Verläufe der Enzymaktivitäten in den Gruppen < 30 SSW und > 30 SSW analysiert und der 3. Lebenstag und

die 3. Lebenswoche als Zeitpunkte für die statistische Analyse festgelegt. Im zweiten Schritt wurde die Analyse nur für die Frühgeborenen von < 28 und > 32 SSW durchgeführt, um den möglichen Einfluss des Gestationsalters besser diskriminieren zu können.

#### **2.4) Mögliche Einflussfaktoren**

Das Gestationsalter, also der Grad der Unreife, stellt bei Frühgeborenen den wichtigsten Einflussfaktor auf die Häufigkeit von Komplikationen und das Outcome dar. Ein zweiter wichtiger Faktor ist die Schwere der Erkrankung in den ersten Lebenstagen. Hingegen konnte in den Voruntersuchungen [25, 31] gezeigt werden, dass der Geburtsmodus, das Geschlechts und die Gabe pränataler Steroide an die Mutter keinen Einfluss auf die Cortisolproduktionsraten hatten. Daher soll sich die Analyse auf die Untersuchung des Einflusses von Erkrankung in den durch die Voruntersuchungen definierten Gestationsaltergruppen beschränken.

### **3) Patienten und Methoden**

#### **3.1) Patienten**

Grundlage dieser Promotionsarbeit sind die im Rahmen zweier prospektiver Studien erhobenen Datensätze im DFG-Projekt „Ontogenese und krankheitsbedingte Modulation der Steroidexkretionsarten Frühgeborener“ (DFG: HE 3557/1-1. Lit: [25], [32], [31]). In diesen Arbeiten erfolgte ausschließlich die Betrachtung der summierten Steroidproduktionsraten bzw. Fetalzonosteroiden. Die vorliegende Arbeit analysiert nun, wie im Projektantrag beschrieben, die Bedeutung der Einzelmetabolite in Form von Substrat-/Produkt-Quotienten zur Charakterisierung der Steroidbiosynthese bei Frühgeborenen.

##### **3.1.1) Patientenkollektiv**

In diese Studie wurden alle am Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen, Abt. Neonatologie, im Zeitraum zwischen Juni 2001 und September 2002 entbundenen Frühgeborene < 30 SSW sowie die zwischen November 2001 und November 2002 entbundenen Frühgeborene > 30 SSW aufgenommen. Das Gestationsalter wurde durch den Ballard – Score [36] und rechnerisch nach dem ersten Tag der letzten Menstruationsblutung ermittelt.

##### **3.1.2) Ausschlusskriterien**

Frühgeborene, die mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllten, wurden von der Datenerhebung ausgeschlossen.

- schwere kongenitale Fehlbildungen am Thorax, Abdomen, der inneren Organe oder des Zentralen Nervensystems
- Vitium cordis, mit Ausnahme eines persistierenden Ductus arteriosus, offenen Foramen ovale oder Vorhofseptumdefekt vom Sekundumtyp
- Chromosomenabberationen
- Hydrops fetalis
- Funktionsstörungen oder Anlageanomalien der endokrinen Organe (z.B. Hypothyreose, Adrenogenitales Syndrom, intersexuelles Genitale)

- postnatale Steroidtherapie oder eine pränatale Betamethasontherapie der Mutter i.R. der Lungenreifeinduktion stellte kein Ausschlusskriterium dar

### **3.1.3) Gruppenbildung**

Das Patientenkollektiv wurde nach folgenden Kriterien in die Gruppen „well preterm infants“ (wenig beeinträchtigte Frühgeborene) und „ill preterm infants“ (kranke Frühgeborene) eingeteilt. Diese Zuordnung wurde schon in vorhergehenden Arbeiten verwendet [37, 38].

#### Kriterien für „ill preterm infants“:

- Atemnotsyndrom mit Notwendigkeit einer Surfactanttherapie (beatmete Kinder mit  $FiO_2 > 0,4$  und  $t_cSO_2 < 88\%$ )
- Konnatale Infektion (C-reaktives Protein  $> 10$  mg/l oder Linksverschiebung im Blutbild in den ersten 72 Lebensstunden)
- Nosokomiale Infektion (C-reaktives Protein  $> 10$  mg/l oder Linksverschiebung im Blutbild nach den ersten 72 Lebensstunden)
- Intraventrikuläre Hämorrhagie  $> \text{Grad II}$
- Arterielle Hypotension
- Stoffwechselentgleisungen (Hypo – bzw. Hyperglykämie,  $BE < -10$  mmol/l)

Apnoen oder Bradykardien, wie sie häufig bei Frühgeborenen beobachtet werden, stellten kein Kriterium dar.

#### Kriterien für „well preterm infants“:

Eine Zuordnung in diese Gruppe erfolgte, wenn zum Zeitpunkt der Probengewinnung und 48 h davor und danach (bzw. 24 h an Tag 1 und 2) kein Kriterium der o.g. zutraf.

Zur Objektivierbarkeit wurde zusätzlich bei jeder Probengewinnung und bei jedem Proband der sog. „Score for Neonatal Acute Physiology“ (SNAP) bestimmt [39].

**Tab.1: Score for Neonatal Acute Physiology**

Punkte	1	3	5
RR syst/mmHg	66-80	81-100	>100
RR diast/mmHg	30-35		< 20
HF max/min	180-200	201-250	>250
HF min/min	80-90	40-79	<40
AF/min	60-100	>100	
Temp./°C	35-35,5	33,3-34,9	<33,3
PO <sub>2</sub> /mmHg	50-65	30-50	<30
PO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub>	2,5-3,5	0,3-2,49	<0,3
PCO <sub>2</sub> /mmHg	50-65	66-90	>90
OI=MADxFiO <sub>2</sub> /artpaO <sub>2</sub>	0,07-0,2	0,21-0,4	>0,4
Hk max/%	66-70	>70	
Hk min/%	30-35	20-29	<20
Leukos/x1000	2,0-5,0	<2,0	
ITQ	>0,21		
Neutrophile	500-999	<500	
Thrombos/x1000	30-100	<30	
Harnstoff/mg/dl	40-80	>80	
Kreatinin/mg/dl	1,2-2,4	2,5-4,0	>4,0
Diurese/ml/kg/h	0,5-0,9	0,1-0,49	<0,1
Indirektes Bilirubin			
> 2kg GG/mg/dl	15-20	>20	
</= 2kg GG/mg/dl/kg	5-10	>10	
Dir. Bilirubin/mg/dl	>2		
Natrium max/mmol/l	150-160	161-180	>180
Natrium min/mmol/l	120-130	<120	
Kalium max/mmol/l	6,6-7,5	7,6-9,0	>9,0
Kalium min/mmol/l	2,0-2,9	<2,0	
Ca ion. max/mmol/l	>3,5		
Ca ion. min/mmol/l	0,2-0,25	<0,2	
Ca tot. max/mmol/l	>3		
Ca tot. min/mmol/l	1,25-1,73	<1,25	
Glukose max/mg/dl	150-250	>250	
Glukose min/mg/dl	30-40	<30	
Bicarbonat max/mmol/l	>33		
Bicarbonat min/mmol/l	11-15	<10	
Serum pH	7,2-7,3	7,1-7,19	<7,1
Krampfanfall	Singulär	Multipel	
Apnoe	Stimulation	Keine Stim.	Beatmung
Blut im Stuhl	positiv		

## **3.2) Methoden**

### **3.2.1) Uringewinnung**

Die Glukocorticoid – und Fetalzonenmetabolite wurden zu zuvor definierten Zeitpunkten in 24 – h – Sammelurin bestimmt. Dabei erfolgten die Messungen in der ersten Lebenswoche engmaschig an den Tagen 1, 2, 3 und 5. Dies wurde mit einem erhöhten perinatalen Stress und der höheren Inzidenz neonataler Komplikationen in den ersten Lebenstagen begründet [38]. In den folgenden Lebenswochen erfolgte bis zur Vollendung des 1. Lebensmonats eine Messung wöchentlich sowie einmal im 2. Lebensmonat.

Der 24 – h – Sammelurin wurde in speziellen Einmalwindeln der Firma Pampers® (Procter&Gamble, Schwalbach, Deutschland) aus reiner Zellulose aufgefangen. Es wurden zwei verschiedene Größen benutzt: kleine Windeln (Leergewicht 16 g) für Frühgeborene unter 2300 g und große Windeln (Leergewicht 22 g) für Säuglinge über 2300 g. Um eine Verunreinigung mit Stuhl zu verhindern wurde eine urindurchlässige Gaze zwischen Haut der Patienten und der Zellulosewindel platziert. Die Windeln wurden während der Sammelperiode alle 4 h durch das vorher eingewiesene und geschulte Pflegepersonal der neonatologischen Intensivstation bzw. der neonatologischen Station „Moro“ gewechselt (bei sehr kleinen Patienten teilweise auch erst nach 8 h, um eine ausreichende Urinmenge zu gewährleisten). Anschließend wurden diese erneut gewogen und bis zur Beendigung der 24 – h – Sammelepisode in einem Plastiksack aufbewahrt, um einer Verdunstung weitestgehend entgegenzuwirken. Nach spätestens 36 h wurden die Windeln der Weiterverarbeitung zugänglich gemacht. War dies nicht möglich, wurden sie bei –20 °C eingefroren.

Anschließend wurden die Windeln einer Sammelperiode des jeweiligen Patienten zusammengeführt, ggf. aufgetaut und der Urinextraktion zugeführt. Zunächst wurde die oben beschriebene Gaze aus den Windeln entfernt. Waren die Windeln trotz dieser „Vorsichtsmaßnahme“ stark stuhl – oder mekoniumverschmiert, wurden sie verworfen. Auch bei Durchfallerkrankungen der Säuglinge oder zu geringen Urinmengen pro Windel (< 10 ml bei den Kleinen bzw. < 12 ml bei den Großen) wurden diese entsorgt. Für die eigentliche Uringewinnung stand eine spezielle Hydraulikpresse mit einem Druck von 120 kPa/cm<sup>2</sup> zur Verfügung. Vor dem Pressen wurde die Windel mittig gefaltet, sodass die Zelluloseanteile nach außen gekehrt wurden. Im Anschluss wurde

die gefaltete Windel in einen 1-Liter-Gefrierbeutel der Marke Melitta® (Minden, Deutschland) gelegt, dieser dann fest verschlossen und so unter die Presse gelegt, dass der ausgepresste Urin ungehindert in eine herabhängende Ecke des Beutels abfließen konnte. Dieser Vorgang wiederholte sich insgesamt dreimal. Der Beutel wurde aufgeschnitten, der Urin in ein steriles Plastikgefäß geleitet und bis zur Analyse im Steroidlabor abzentrifugiert und bei einer Temperatur von -80°C eingefroren.

Dieser oben beschriebene Vorgang der Urinsammlung in Vlieswindeln zum Einmalgebrauch wurde schon mehrfach beschrieben, z.B. in *Roberts et Lucas* [40] und *Ahmad et al* [41]. Auch die Extraktion von Steroidmetaboliten wurde bereits in Vorarbeiten evaluiert [34, 42].

Tab.2 zeigt die exzellenten Rückgewinnungsraten der Einzelmetabolite beispielhaft für die Glukocorticoidmetabolite aus den Zellulosewindeln [34].

Tab.2: aus [34]

**Table 2.** *Evaluation of urine collection procedure II: relative recovery of individual urinary glucocorticoid metabolites after extraction from pure cellulose nappies*

	Small nappies, volume incubated (mL)			Medium nappies, volume incubated (mL)		
	15 (n = 5)	30 (n = 5)	45 (n = 5)	30 (n = 5)	50 (n = 5)	70 (n = 5)
Recovery of 11-hydroxy-metabolites (%)						
F	85	93	97	90	97	101
6 $\beta$ -OH-F	59	70	90	66	70	93
THF	112	112	112	101	99	101
$\alpha$ THF	115	117	119	100	102	104
$\beta$ -C	104	101	109	96	101	102
Total 11-hydroxy-metabolites	90	96	104	87	91	100
Recovery of 11-keto-metabolites (%)						
THE	101	100	105	97	99	101
1 $\beta$ -OH-THE	108	109	121	109	107	108
6 $\alpha$ -OH-THE	115	116	118	111	111	112
$\alpha$ -CL	110	112	116	103	115	111
6 $\alpha$ -OH- $\alpha$ -CL	108	109	110	107	111	112
$\beta$ -CL	109	109	110	102	107	104
1 $\beta$ -OH- $\beta$ -CL	93	99	105	96	105	102
6 $\alpha$ -OH- $\beta$ -CL	107	110	106	114	118	114
Total 11-keto-metabolites	107	107	109	107	111	110

Various sizes of nappies were employed and different amounts of aliquots of pool urine were used for incubation. To correct for the difference between inoculated and extracted volume, amounts of recovered steroids were calculated by multiplying the concentration of the steroid with the respective inoculated volumes. Then, the recovery rate of the individual steroid is presented as percentage of the inoculated amount of the metabolite.



### 3.2.2) Labordiagnostik mittels quantitativer GC-Massenspektrometrie

In der Arbeit von *Heckmann et al* [25] wurde erstmals zur Charakterisierung des Steroidmetabolismus bei Frühgeborenen die Gaschromatografie - Massenspektrometrie eingesetzt, die frei von Kreuzreaktivität ist, über eine hohe Spezifität verfügt und nicht invasiv die Bestimmung der Steroidmetabolite aus dem Urin erlaubt.

Die asservierten Proben wurden in das Steroidforschungslabor (Leitung: Prof. Dr. S. A. Wudy) des Zentrums für Kinderheilkunde und Jugendmedizin am Standort Gießen des Universitätsklinikums Gießen und Marburg gebracht und dort weiter verarbeitet.

Die Urinsteroidprofile wurden mittels quantitativer Gaschromatographie – Massenspektrometrie nach der Methode von *Shackleton et al* [35, 43] erstellt. Die Technik wird ausführlich im Buchbeitrag von *Wudy et al* [44] dargestellt, kurz beschrieben funktioniert sie folgendermaßen:

Aus einer 5 ml großen Portion aus dem 24-h-Sammelurin werden freie und konjugierte Harnsteroiden mittels Festphasenextraktion (Sep-Pak® C18-Kartusche, Fa. Waters, Milford, USA) herausgelöst. Es erfolgt eine enzymatische Hydrolyse (Aryl-Sulfatase aus *Helix Pomatia*, Fa. SIGMA, Taufkirchen, Deutschland). Nach erneuter Festphasenextraktion und Zugabe von drei internen Standards (5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -diol, Stigmasterol und Cholesterylbutyrat) beginnt die Derivatisierung der Harnsteroiden zu Methyloxim-Trimethylsilyl-Ethern. Anschließend wurde die GS-MS durchgeführt. Dazu wurde der Gaschromatograph (GC-Serie 6890, Agilent Technologie GmbH, Böblingen, Deutschland), der mit einem Agilent Injektor der Serie 7683 ausgestattet war, direkt an ein Massenspektrometer (Agilent 5973N MSD) angeschlossen. Die Messung erfolgte an einer OV-1 fused silica Kapillare (Optima-1-MS, 25 m x 0,2 mm innerer Durchmesser, Filmdicke 0,1  $\mu$ m, Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) mittels „selected ion monitoring“ („SIM“-Modus, Einzelmassenregistrierung, Massenfragmentographie). Helium dient als Trägergas. Die gesamte Datenauswertung erfolgt EDV – gestützt.

Die folgenden C21-Metabolite, d.h. Glukocorticoidmetabolite, wurden so bestimmt: Tetrahydrocortison,  $\alpha$ -Cortolon,  $\beta$ -Cortolon, 6 $\alpha$ -Hydroxy- $\alpha$ -Cortolon, 1 $\beta$ -Hydroxy-Tetra-Hydrocortison, 6 $\alpha$ -Hydroxy- $\alpha$ -Cortolon, 6 $\alpha$ -Hydroxy- $\beta$ -Cortolon, 1 $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -

Cortolon, Tetrahydrocortisol, Allotetrahydrocortisol,  $\alpha$ -Cortol,  $\beta$ -Cortol, Cortisol, 6 $\beta$ -Hydroxy-Cortisol.

Die Interassay-Präzision (n=8) schwankte zwischen 1,3% für 6 $\alpha$ -Hydroxy- $\beta$ -Cortolon und 7,0% für 1 $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Cortolon. Die Intraassay-Präzision (n=8) schwankte zwischen 0,5% für Tetrahydrocortison und 5,3% für 1 $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Cortolon.

Dabei wurden die täglichen Ausscheidungsmengen auf das Körpergewicht und die Kreatininausscheidung korrigiert ( $\mu\text{g/kg/d}$  per mg Kreatinin). Kreatinin wurde nach der Jaffé-Methode bestimmt.

Die folgenden 3 $\beta$ -Hydroxy-5-en-Steroide, d.h. Fetalzonensteroide, wurden so bestimmt: 5-Androsten-3 $\beta$ -17 $\alpha$ -diol, 16 $\alpha$ -Hydroxy-Dehydroepiandrosteron, 16 $\beta$ -Hydroxy-Dehydroepiandrosteron, Androstentriol-16 $\alpha$ , 15 $\beta$ ,16 $\alpha$ -Hydroxy-Dehydroepiandrosteron, 16-O-Androstendiol, 16 $\alpha$ ,18-Hydroxy-Dehydroepiandrosteron, 15 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Hydroxy-Pregnenolon, 16 $\alpha$ -Hydroxy-Pregnenolon, Androstentetrol, 15 $\beta$ -Hydroxy-Pregnenetetrol, 21-Hydroxy-Pregnenolon, 3 $\beta$ ,20 $\alpha$ ,21-Pregnenetriol, P<sup>5</sup>-Tetrol.

Die Interassay-Präzision (n=8) schwankte zwischen 1,54% für Androstentriol-16 $\alpha$  und 8,2% für 16-O-Androstendiol. Die Intraassay-Präzision (n=8) schwankte zwischen 0,48% für Androstentriol-16 $\alpha$  und 3,54% für 5-Androsten-3 $\beta$ -17 $\alpha$ -Diol.

Analog zu den Glukocorticoidmetaboliten wurden die Ausscheidungsraten auf Körpergewicht und Kreatininausscheidung korrigiert ( $\mu\text{g/kg/d}$  per mg Kreatinin).

Die Harnsteroide mit Abkürzungen und Systematischen Bezeichnungen kann man der Tabelle im Anhang entnehmen.

### **3.2.3) Berechnung der Enzymaktivitäten**

Die Bildung von Quotienten zur Evaluierung einer Enzymaktivität wurde schon in älteren Arbeiten [9] sowie in aktuellen Veröffentlichungen [45] benutzt. Dabei wurden die Metabolite der Steroidbiosynthese im Serum der Patienten gemessen. Diese Quotienten bestehen aus den Metaboliten vor dem Enzym (=Substrat) im Zähler und den Metaboliten nach dem Enzym (=Produkt) im Nenner.

Die Enzyme der Steroidbiosynthese können aber auch non-invasiv über die im Urin gemessenen Metabolite ihrer Substrate bzw. Produkte charakterisiert werden. In der Arbeit von *Caulfield et al* [35] zur Diagnostik kongenitaler adrenaler Hyperplasie, z.B. 21-Hydroxylasemangel als Enzym des klassischen AGS, wurden entsprechende Ratios entwickelt und validiert.

Im Einzelnen wurden folgende Formeln verwendet (Abkürzungen siehe Anhang):

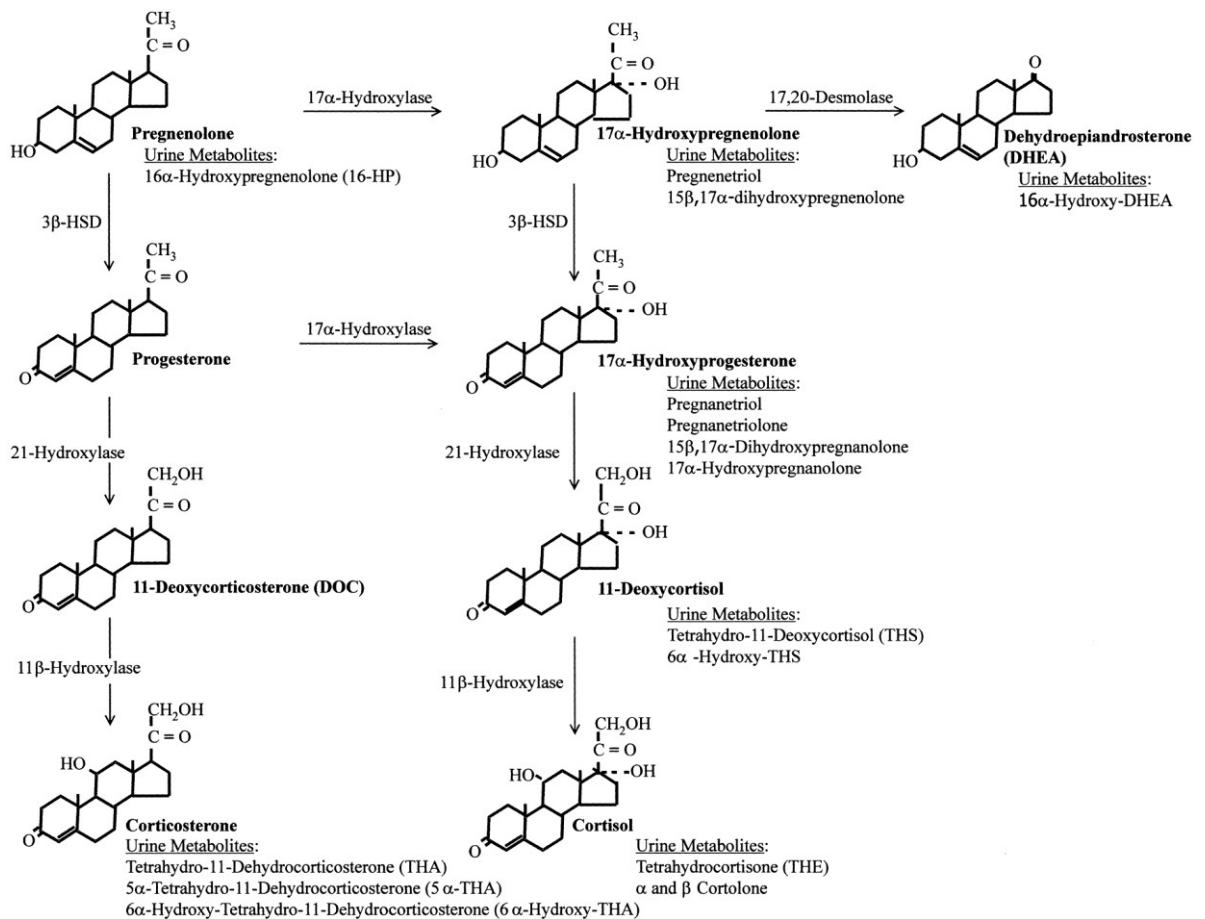
- 17HYD:  $16\alpha\text{-OH-P}^5\text{-olon} / 16\alpha\text{-OH-DHEA}$
- 3 $\beta$ HSD:  $\text{DHEA} \cdot 100 / \text{CM}$
- 21HYD: 1)  $15\beta, 17\alpha\text{-OH-P}^5\text{-olon} \cdot 100 / \text{CM}$   
           2)  $\text{P}^5\text{-olon-5}\beta, 3\alpha \cdot 100 / \text{CM}$   
           3)  $\text{Pregnanetriol (PT)} \cdot 100 / \text{CM}$
- 11 $\beta$ HYD:  $\text{THS} \cdot 100 / \text{CM}$
- 11 $\beta$ HSD:  $\text{THF} + \alpha\text{THF} + \alpha\text{C} + \beta\text{C} + \text{F} / \text{THE} + \alpha\text{Cl} + \beta\text{Cl}$

Während zur Berechnung der Cortisolproduktion bei Erwachsenen Tetrahydrocortison, Tetrahydrocortisol und 5 $\alpha$ -Tetrahydrocortison verwendet wurden, zeigte sich in vorangegangenen Studien, dass diese bei Neonaten in zu geringen Mengen nachzuweisen waren und überwiegend 11-Keto-Steroidmetabolite gefunden wurden [35]. Außerdem wird die Summe der Cortisolmetabolite in den ersten postnatalen Tagen möglicherweise auch durch maternale Substrate verfälscht.

Daher wurde stattdessen die Summe aus Tetrahydrocortison (THE),  $\alpha$  – Cortolon ( $\alpha\text{Cl}$ ) und  $\beta$ -Cortolon ( $\beta\text{Cl}$ ) verwendet (=CM), die in bisherigen Studien quantitativ ca. 20-50% aller Cortisolmetabolite entspricht [46, 47].

Die Quotienten der Enzyme der Steroidbiosynthese verhalten sich umgekehrt proportional zur Enzymaktivität. Auch die Ratio der 11 $\beta$ -Hydroxy-Steroid-Dehydrogenase Typ II, das Schlüsselenzym des Cortisolabbaus, verhält sich umgekehrt der Aktivität. Abb. 5 zeigt die jeweiligen Urinmetabolite schematisch.

Abb.5: Enzyme und deren Urinmetabolite n. [35]



### 3.2.4) Patientendaten

Für jeden Patienten wurden vor Beginn der Studie die Stammdaten mittels Erhebungsbogen systematisch erfasst. Zu diesen Daten gehörten Gestationsalter (bestimmt nach Fröhschall und Ballard Score [36]), Geburtsgewicht, Geschlecht, Nabelschnur-pH, 5-Minuten-APGAR, Geburtsmodus (spontan bzw. Sectio caesarea), SGA („small for gestational age“, d.h. Geburtsgewicht < 10. Perzentile), Temperatur bei Aufnahme, Gabe von pränatalen Steroiden (diese wurde als komplett bezeichnet, wenn spätestens 24 h präpartal eine zweimalige Betamethasongabe nach AWMF-Leitlinien [48] bei der Mutter erfolgte) und die Frage nach endokrinologischen Erkrankungen in der Familie. Der SNAP [39] für den Aufnahmetag wurde erfasst. Außerdem wurden folgende Diagnosen bei Entlassung bzw. Tod festgehalten: Periventriculäre Leukomalazie [49], Intraventriculäre Hämorrhagie [50], Infektion nach oben beschriebenen Kriterien, nachgewiesene Keime in der Blutkultur, Bronchopulmonale Dysplasie (BPD) [51], Chronic Lung Disease (CLD) [52], Atemnotsyndrom nach

Stadieneinteilung [53], Retinopathia praematororum [54] und Nekrotisierende Enterocolitis [55].

Im Verlauf der Datensammlung wurden an jedem Tag der Uringewinnung die Verlaufsdaten mittels standardisierten Bogen erhoben. Dabei wurden die Kriterien der Gruppeneinteilung in „well“ und „ill“, die weiter oben beschrieben wurden, abgefragt. Auch der SNAP [39] wurde an allen Messtagen dokumentiert.

### **3.2.5) Statistik**

Alle Messungen der Steroidmetabolite im Urin wurden eigens gesammelt und die Daten in eine Excel-Datenbank (Excel 2010, Microsoft® Corporation, Redmond, WA, USA) eingegeben. Anschließend erfolgte die selbständige Berechnung der Quotienten nach o.g. Formeln. In Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Statistik wurde die Analyse geplant und ausgewertet (Version 8 statistical package, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Die statistische Beratung und Bearbeitung erfolgte durch Herrn Dr. R.-H. Bödeker (Leiter der AG Medizinische Statistik) und Frau C. Scheibelhut.

Zur deskriptiven Auswertung des Patientenkollektivs verwendeten wir den Mann-Whitney U-Test für quantitative und den exakten Test auf Unabhängigkeit nach Fisher (Fisher's exact test) für qualitative Merkmale.

Um den Einfluss des Gestationsalters zu untersuchen, wurde die bereits in anderen Arbeiten bestehende Kategorisierung des Patientenkollektivs in eine Gruppe < 30 SSW und eine andere > 30 SSW (z.B. [32], [31], [34]) zunächst beibehalten. Durch longitudinale Darstellung der Einzelverläufe wurden für das jeweilige Enzym zwei Zeitpunkte mit der größten Diskrepanz beider Gruppen definiert, zwischen denen die statistischen Tests durchgeführt wurden. Für jeden Probanden und jedes Enzym wurden einheitlich der 3. Lebenstag und die 3. Lebenswoche als Testzeitpunkte festgelegt. Da es sich um nicht normalverteilte Merkmale handelte, wählten wir nichtparametrische Testverfahren. Zur Erhöhung der Trennschärfe bei der Untersuchung des Einflusses des Gestationsalters wurden in den weiteren Analysen zwei Gestationsaltergruppen mit < 28 SSW und > 32 SSW gebildet. Wir untersuchten die Enzymaktivitäten zunächst in einem nicht-parametrischen dreifaktoriellen Modell, um den Einfluss des Gestationsalters (Kategorisierung in < 28 SSW und > 32 SSW), des postnata-

len Alters (Tag 3 und Woche 3) und von Krankheit (Definition gesund oder krank) zu prüfen. Ein Einfluss von Erkrankung auf die Enzymaktivitäten wurde nicht gefunden (siehe 4) im Anhang). Daher erfolgte die Analyse im zweifaktoriellen Modell. Das adäquate Auswertungsverfahren wäre die zweifaktorielle Varianzanalyse (VA), die gleichzeitig drei Hypothesen testen kann:

1) Unterscheiden sich  $FG < 28$  SSW und  $FG > 32$  SSW bezüglich des Zielparameters voneinander (OHNE Berücksichtigung des postnatalen Alters; globaler Einfluss des Gestationsalters?)

2) Hat das postnatale Alter (Tag 3 und Woche 3) einen Einfluss auf die Werte des Zielparameters (OHNE Berücksichtigung der zwei Gestationsaltergruppen; globaler Einfluss des postnatalen Alters?)

3) Die - in der Regel - wichtigste Hypothese: Ist der (mögliche) Einfluss, den das postnatale Alter hat, in den beiden Gestationsaltergruppen unterschiedlich?

Anders formuliert lautet die Frage: Hat das Gestationsalter einen Einfluss auf die Veränderung der Werte im postnatalen Verlauf?

Zunächst wird geprüft, ob man die Wechselwirkungshypothese ablehnen kann. Wenn nicht, werden die globalen Tests betrachtet.

Voraussetzung für eine VA ist aber die Normalverteilung der Daten, die bei dem interessierenden Parameter nicht gegeben ist.

Daher wurde folgendermaßen vorgegangen:

a) Zur Beantwortung der Fragestellung, ob es eine Wechselwirkung zwischen Gestationsalter und postnatalem Alter gibt, wurde für jeden Patienten die Differenz des interessierenden Parameters "Woche 3 minus Tag 3" gebildet und dann mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests untersucht, ob man bezüglich dieser Differenz Unterschiede zwischen den beiden Gestationsaltergruppen aufzeigen kann. Ein solcher Unterschied würde bedeuten, dass die postnatale Veränderung vom Gestationsalter beeinflusst wird, also eine Wechselwirkung vorliegt. Dazu erfolgt die Angabe des Signifikanzniveaus als  $p_{\text{Zeit} \times \text{Gruppe}}$

b) Zur Untersuchung eines globalen Zeiteffekts werden alle FG, egal ob  $< 28$  SSW oder  $> 32$  SSW, gemeinsam betrachtet und mit Hilfe des Vorzeichen-Rang-Tests (es han-

delt sich um abhängige Stichproben, Vor- und Nachwert desselben Patienten) wird überprüft, ob sich die Werte an Tag 3 von den Werten in Woche 3 unterscheiden. Dazu erfolgt die Angabe des Signifikanzniveaus als  $p_{\text{Zeit}}$

Da der Vorzeichen-Rang-Test zwar keine Normalverteilung voraussetzt, dafür aber gleiche Verteilungsformen zu den beiden Zeitpunkten, wurden die Ergebnisse mit Hilfe des Vorzeichen-Tests, der diese Voraussetzung nicht hat, kontrolliert.

c) Bei der Überprüfung eines "globalen Gruppeneffekts" bildet man für jeden Patienten die Summe der beiden Messungen an Tag 3 und in Woche 3 und vergleicht diese Summe/Durchschnitt in den beiden Gruppen. Man schaut also, ob die beiden Gruppen auf demselben Niveau liegen. Da es sich um unabhängige Stichproben handelt, wird dies mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test getestet. Dazu erfolgt die Angabe des Signifikanzniveaus als  $p_{\text{Gruppe}}$

Die Auswertung erfolgte ausschließlich nach den Kriterien der explorativen Statistik.

### **3.2.6) Ethische Evaluation**

Vor Beginn der Studie wurde diese der Ethikkommission des Klinikums (Aktenzeichen 04/02) vorgelegt, die dieser zustimmte. Die Eltern wurden anhand eines standardisierten Aufklärungsbogens (siehe Anhang) über die Durchführung der Uringewinnung, die Risiken und dem möglichen Nutzen der Studie ausführlich aufgeklärt. Durch eigenhändige Unterschrift willigten sie ein, eine Revidierung der Einverständniserklärung (siehe Anhang) war zu jedem Zeitpunkt möglich.

Alle Daten der Probanden wurden anonymisiert erfasst und bearbeitet.

## 4) Ergebnisse

### 4.1) Beschreibung des Patientenkollektives

An dieser Studie nahmen nach Anwendung der Einschluss – und Ausschlusskriterien sowie schriftlicher Einwilligung durch die Eltern insgesamt 144 Frühgeborene zwischen 23 und 36 SSW teil. Diese wurden am Zentrum für Kinder – und Jugendmedizin des Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen, in der Zeit zwischen 6/2001 und 11/2002 entbunden und betreut.

Es erfolgte nach weiter oben genannten Kriterien eine Einteilung in „wenig beeinträchtigte“ („well“) und „kranke“ („ill“) Frühgeborene. Dabei wurden 76 Patienten der Gruppe „wenig beeinträchtigt“ und 68 Patienten der Gruppe „krank“ zugeordnet. Tab.3 zeigt die Verteilung wichtiger neonataler Charakteristika unter Angabe des Signifikanzniveaus in beiden Gruppen.

Tab.3: Verteilung neonataler Charakteristika in den Gruppen

	„well“ n=76	„ill“ n=68	p
Gestationsalter / Wochen *	32,7 (24-36,9)	28,1 (23,5-35,6)	< 0,001 <sup>#</sup>
Geburtsgewicht / g *	1825 (640-2920)	1095 (457-2700)	< 0,001 <sup>#</sup>
Geschlecht (m/w)	31 / 45	29 / 39	0,86 <sup>##</sup>
SGA	6 (8%)	7 (10%)	0,77 <sup>##</sup>
Pränatale Steroide (gesamt)	40 (56%) n=71	47 (72%) n=65	0,083 <sup>##</sup>
Sectio	67 (88%)	60 (88%)	1,0 <sup>##</sup>
Art. Nabelschnur pH *	7,32 (7,14-7,44) n=66	7,31 (7,12-7,62) n=62	0,75 <sup>#</sup>
5-Min.-APGAR *	9 (5-10)	8 (1-10) n=67	0,006 <sup>#</sup>

\* Median und Minimum/Maximum

# Mann-Whitney-U-Test

## Fischer's exakter Test



Kranke Frühgeborene waren unreifer, hatten ein deutlich niedrigeres Geburtsgewicht und einen im Median um eins niedrigeren 5 Minuten APGAR. Die Mütter der kranken Frühgeborenen erhielten häufiger pränatale Steroide zur Induktion der Lungenreife.

Hinsichtlich der Auswertung von Art und Schwere der neonatologischen Erkrankungen in Abhängigkeit der Gruppenzugehörigkeit standen 140 Datensätze zur Verfügung (76 „wenig beeinträchtigt“, 64 „krank“). Tab.4 zeigt deren Häufigkeit.

Tab.4: Häufigkeiten neonataler Erkrankungen in den Gruppen

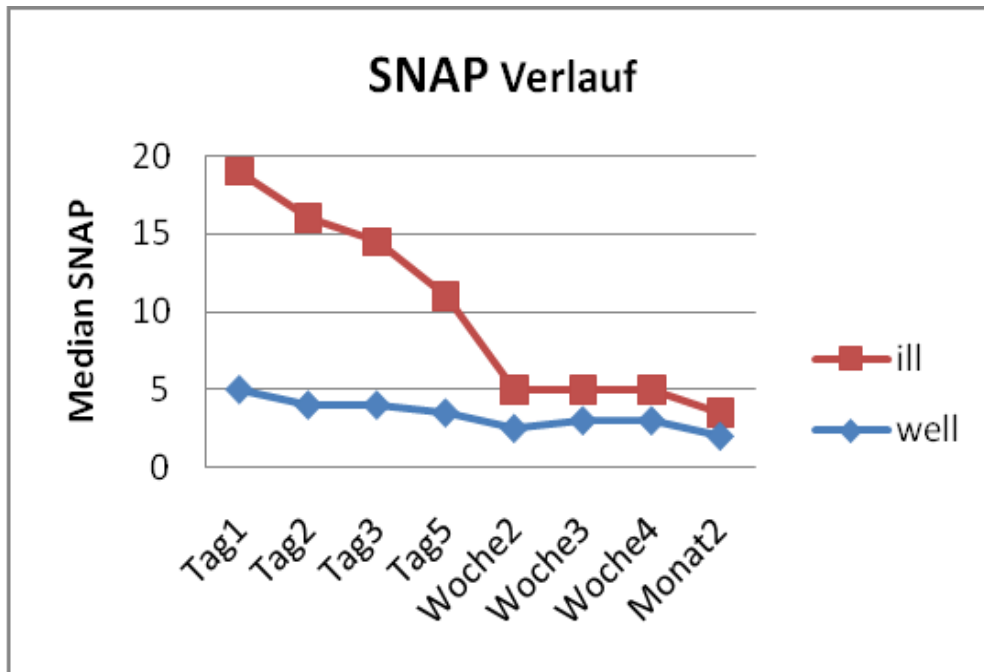
	„well“ n=76	„ill“ n=64	P *
Tod	0 (0%)	5 (8%)	0,018
Koninatale Infektion	0 (0%)	30 (47%)	<b>&lt;0,001</b>
Nosokomiale Infektion	0 (0%)	30 (47%)	<b>&lt;0,001</b>
ANS	35 (46%)	54 (84%)	<b>&lt;0,001</b>
BPD	2 (3%)	21 (33%)	<b>&lt;0,001</b>
PDA	9 (12%)	29 (45%)	<b>&lt;0,001</b>
NEC	0 (0%)	5 (8%)	0,018
ROP	3 (4%)	8 (13%)	0,11
IVH	7 (9%)	19 (30%)	0,002

\* Fischer's exakter Test

Die Ergebnisse entsprechen der Gruppendifinition. Fünf Kinder der Gruppe der kranken Frühgeborenen verstarben vor Entlassung.

Abb. 6 zeigte den zeitlichen Verlauf der SNAP – Werte in den beiden Gruppen. Es zeigt sich in den ersten 4 Lebenswochen ein Unterschied zwischen den „kranken“ und „wenig beeinträchtigten“ Probanden ( $p < 0,0002$  für SNAP Tag 1 bis Woche 4). Im 2. Lebensmonat bestand nur ein Trend zu höheren SNAP-Werten bei den kranken Frühgeborenen (Monat 2  $p = 0,06$ ).

Abb.6: Zeitlicher Verlauf der SNAP – Werte



Die Einteilung der Patienten nach dem Gestationsalter wurde schon in verschiedenen Arbeiten angewandt [29] [31] [38]. Tab.5 zeigt die Verteilung der perinatalen Parameter nach SSW getrennt.

Tab.5: Verteilung neonataler Charakteristika getrennt nach SSW

	< 30 SSW n=61	> 30 SSW n=79
Gestationsalter / Wochen *	27,2 (24 - 30)	33,3 (30 – 36,9)
Geburtsgewicht / g *	1000 (460 - 1690)	1980 (1090 - 2920)
Geschlecht (m/w)	31 / 30	52 / 27
SGA	4 (6%)	8 (10%)
Pränatale Steroide (gesamt)	51 (84%)	34 (43%)
Sectio	52 (85%)	72 (91%)
Art. Nabelschnur pH *	7,31 (7,12-7,46)	7,31 (7,1-7,62)
5-Min.-APGAR *	8 (5-10)	9 (1-10)

\* Median und Minimum/Maximum

Mütter von FG < 30 SSW wurden vor der Geburt deutlich häufiger mit Steroiden zur pränatalen Lungenreife behandelt. Statistische Unterschiede in der Sectiofrequenz, dem Nabelschnur - pH sowie dem 5 - Minuten - APGAR fanden sich im Gruppenvergleich nicht.

Tab.6 zeigt analog zu Tab.4 die Häufigkeit der neonatalen Erkrankungen getrennt nach dem Gestationsalter.

Tab.6: Häufigkeiten neonataler Erkrankungen getrennt nach SSW

	<b>&lt; 30 SSW</b> <b>n=61</b>	<b>&gt; 30 SSW</b> <b>n=79</b>	<b>P *</b>
Tod	5 (8%)	0 (0%)	<b>0,012</b>
Konnatale Infektion	20 (33%)	10 (13%)	<b>0,005</b>
Nosokomiale Infektion	27 (44%)	3 (4%)	<b>&lt;0,001</b>
ANS	54 (88%)	35 (44%)	<b>&lt;0,001</b>
BPD	23 (38%)	0 (0%)	<b>&lt;0,001</b>
PDA	32 (52%)	6 (7%)	<b>&lt;0,001</b>
NEC	5 (8%)	0 (0%)	<b>0,012</b>
ROP	10 (16%)	1 (1%)	<b>0,001</b>
IVH	21 (34%)	5 (6%)	<b>&lt;0,001</b>

\* Fischer's exakter Test

Die typischen neonatalen Erkrankungen und die postnatalen Risiken der Frühgeburtlichkeit traten bei den sehr kleinen Frühgeborenen erwartungsgemäß häufiger auf. Auch die Infektionsrate war im Vergleich zu den Patienten > 30 SSW deutlich erhöht.

## 4.2) Verlauf der Enzymaktivitäten in Abhängigkeit vom Gestationsalter

### 17 $\alpha$ -Hydroxylase:

Dieses Enzym ist ein Schlüsselenzym der Cortisolsynthese und katalysiert die Umwandlung von Pregnenolon zu 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolon bzw. Progesteron zu 17 $\alpha$ -Hydroxyprogesteron. Es wird intrauterin von der fetalen Zone synthetisiert und steht am Beginn der Steroidbiosynthese. Eine Minderaktivität dieses Enzyms führt zu einem Mangel an Corticosteroiden und Sexualhormonen.

Abb. 7a zeigt postnatal den zeitlichen Verlauf der berechneten Enzymquotienten in Abhängigkeit vom Gestationsalter nach Gliederung in Gruppen <30 und >30 SSW.

Zu beachten ist die umgekehrte Proportionalität der ermittelten Quotienten zur Enzymaktivität.

Es zeigte sich ein Abfall der Enzymaktivität um den Faktor 2 bis 3 zum Ende der ersten Lebenswoche, der in der Gruppe der reiferen Frühgeborenen ausgeprägter war.

Abb.7a: Enzymquotienten <30 vs. >30 SSW

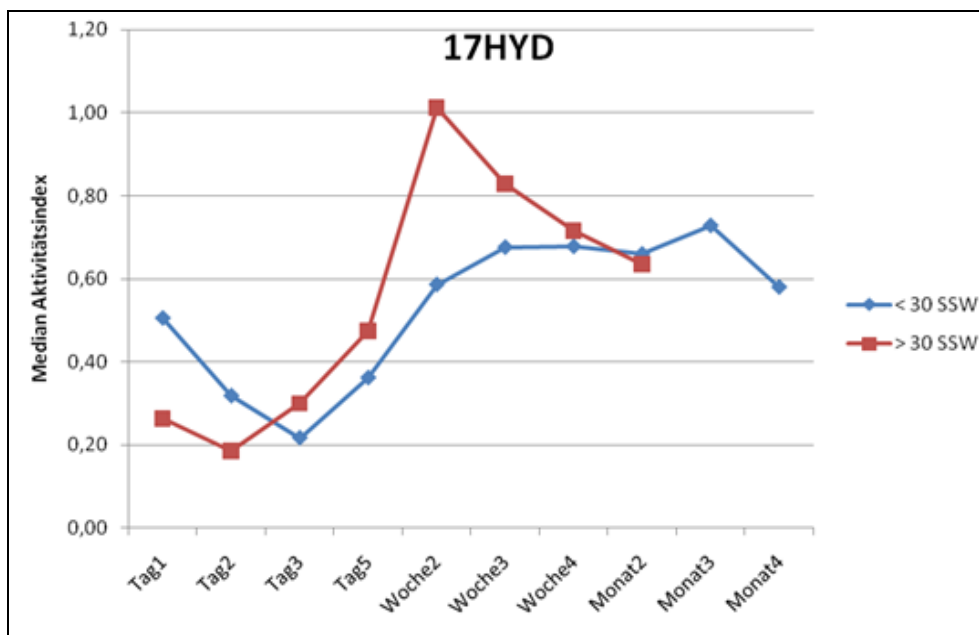


Abb. 7b zeigt die Mediane der Enzymaktivitäten an den Untersuchungszeitpunkten Tag 3 und Woche 3 nach Gestationsaltergruppen < 28 und > 32 SSW. Die Veränderungen des Medians dienen der Anschaulichkeit und entsprechen nicht dem Median der Veränderungen, daher zeigt Abb. 7c die Verteilung der Differenzen. In der zweifaktoriellen nichtparametrischen Analyse fanden sich jedoch keine Wechselwirkungen oder globalen Effekte ( $p_{\text{Zeit} \times \text{Gruppe}}=0,131$ ;  $p_{\text{Zeit}}=0,211$  bzw.  $p_{\text{Gruppe}}=0,611$ ).

Abb.7b: Enzymquotienten zu den Zeitpunkten Tag3 und Woche3

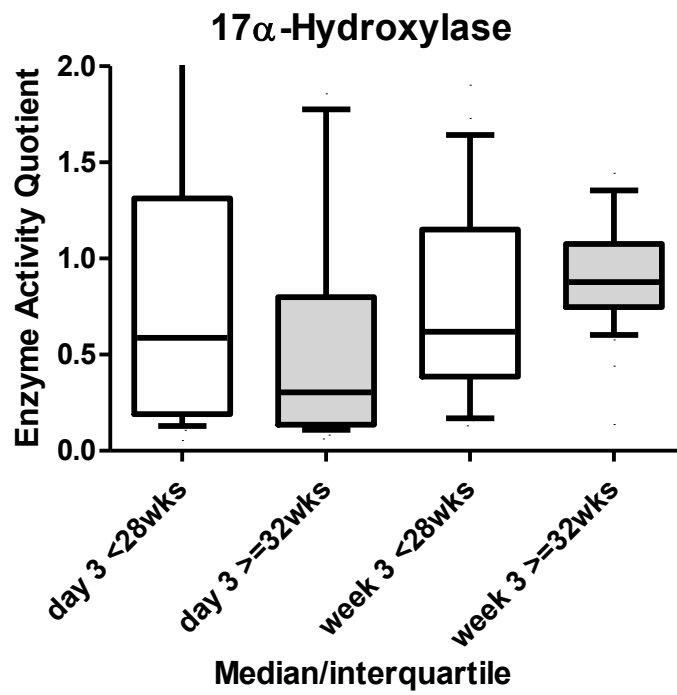
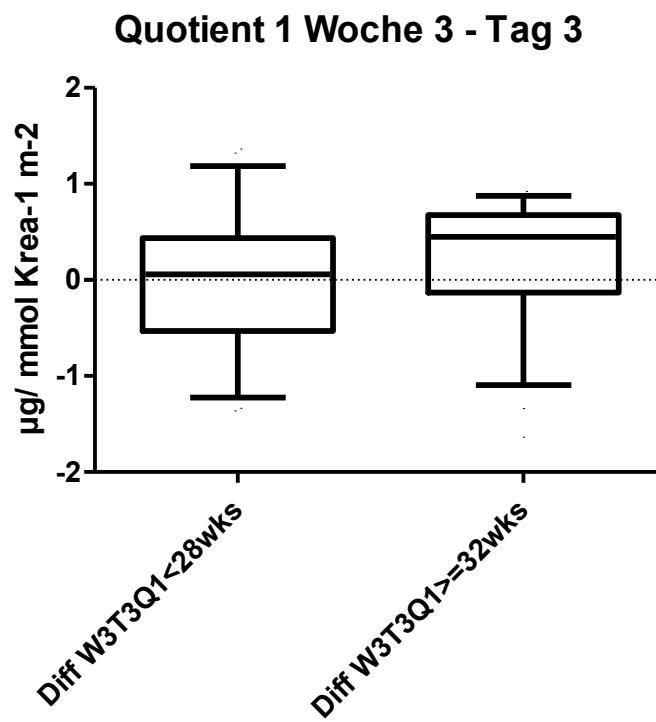


Abb.7c: Differenzen der Enzymaktivität zwischen Tag3 und Woche3



### 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase:

Die 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, ebenfalls ein Schlüsselenzym der Steroidbiosynthese, katalysiert die Umwandlung des Pregnenolon in das Progesteron. Intrauterin zeigt es erst im dritten Trimester eine zunehmende Aktivität [6]. Der intrauterine Block der 3 $\beta$ -HSD erfordert zur Cortisolsynthese die Bereitstellung von Progesteron durch die Plazenta (fetoplazentare Einheit).

Abb. 8a zeigt den entsprechenden Verlauf der errechneten Enzymquotienten.

Zu beachten ist ebenfalls die umgekehrte Proportionalität des Quotienten zur eigentlichen Enzymaktivität.

Es zeigt sich eine Zunahme der Enzymaktivität vom Ende der ersten Lebenswoche zur 3. Woche bei den unreifen Frühgeborenen < 30 Gestationswochen. Bei den reiferen Frühgeborenen > 30 Wochen fand sich diese Änderung nicht.

Abb.8a: Enzymquotienten <30 vs. >30 SSW

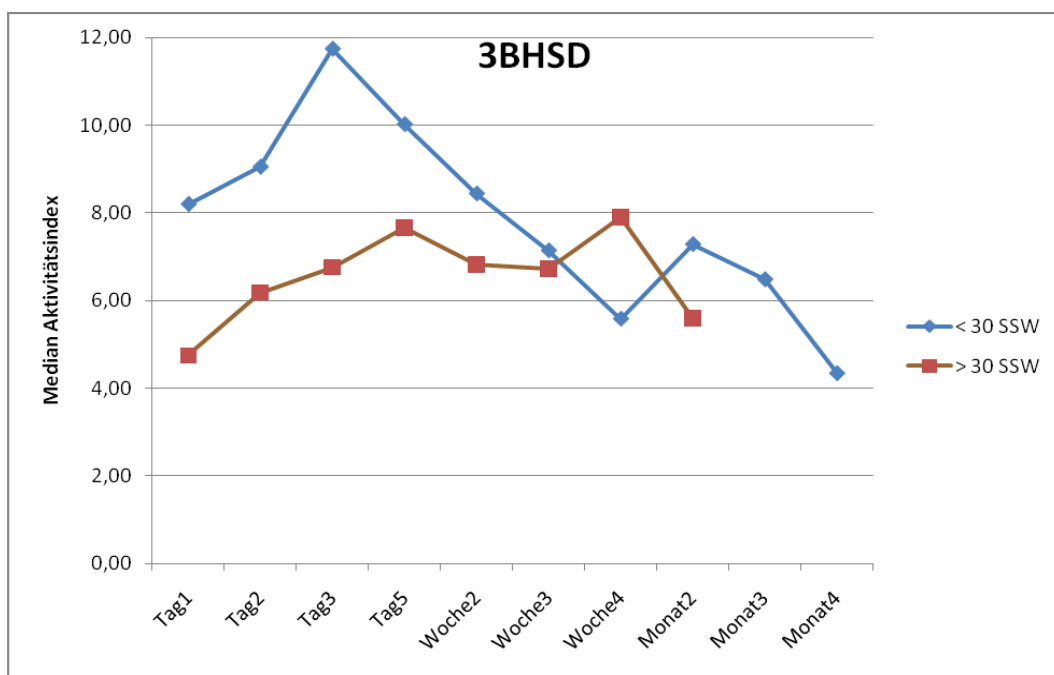


Abb. 8b zeigt die entsprechenden Mediane der Aktivitäten der 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase am dritten Lebenstag und dritter Lebenswoche nach Gruppeneinteilung in < 28 SSW und > 32 SSW, Abb. 8c wiederum die Verteilung der Differenzen. Es fand sich eine Wechselwirkung beider Parameter, d.h. SSW und Zeitpunkt ( $p_{\text{Zeit} \times \text{Gruppe}} = 0,019$ ) im Sinne einer stärkeren Zunahme der Enzymaktivität bei FG < 30 SSW.

Abb.8b: Enzymquotienten zu den Zeitpunkten Tag3 und Woche3

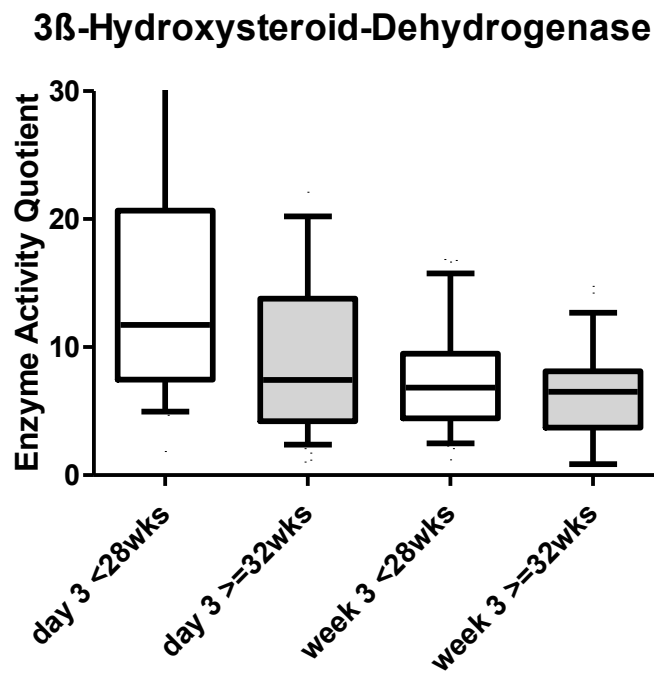
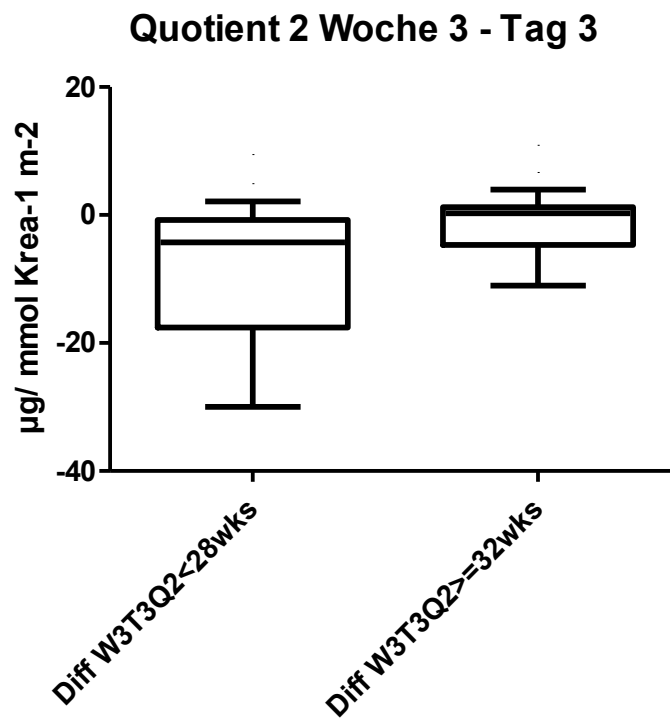


Abb.8c: Differenzen der Enzymaktivität zwischen Tag3 und Woche3



### 21-Hydroxylase:

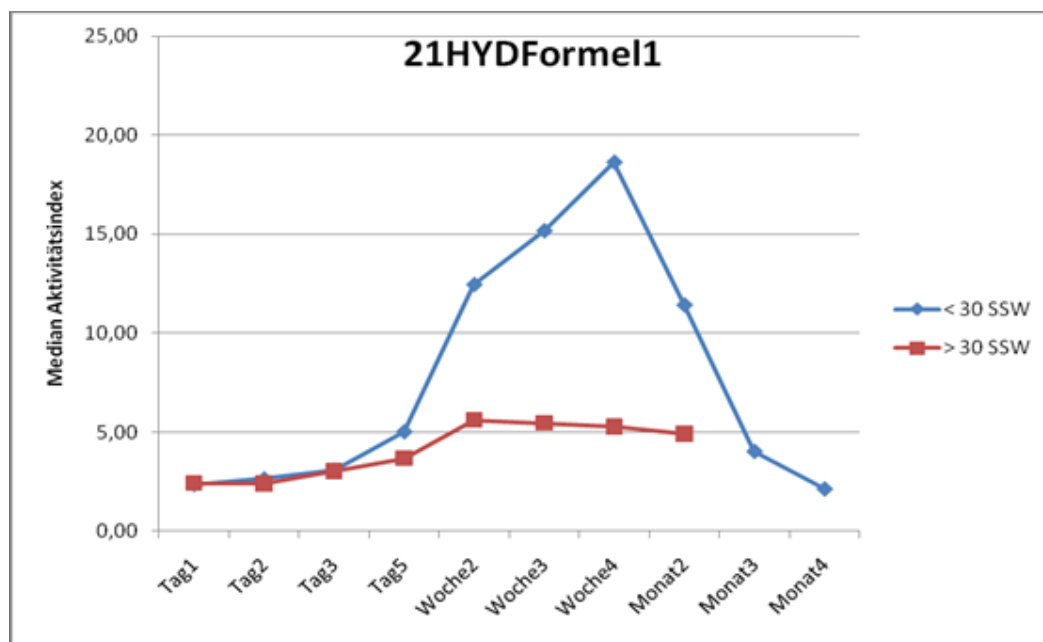
Der Mangel an diesem Enzym stellt das klassische Adrenogenitale Syndrom dar. Ohne dieses Enzym, welches die Reaktion der Progesterone in die Vorstufen des Cortisols bzw. der Mineralocorticoide katalysiert, kommt es zu einem Mangel dieser Steroide und zu einem Überangebot an Sexualhormonen.

Abb. 9a zeigt die zeitlichen Verläufe analog zu den vorherigen Enzymen. Bei der 21-Hydroxylase standen uns insgesamt drei Formeln zur Berechnung des Enzymquotienten zur Verfügung.

Auch diese Quotienten verhalten sich umgekehrt proportional zur Enzymaktivität.

Bei allen Formeln zeigt sich ein ähnlicher Verlauf mit einer Abnahme der Enzymaktivität ab dem Ende der ersten Lebenswoche für die sehr unreifen Frühgeborenen < 30 Wochen. Ein anderes Bild ergibt sich bei den Frühgeborenen > 30 Wochen. Während sich für die erste Formel ein ähnlicher, aber längst nicht so ausgeprägter Abfall der Enzymaktivität wie bei den unreiferen Frühgeborenen zeigte, ergab sich keine Änderung in der zweiten Formel. Bei Betrachtung der dritten Formel kam es hingegen zu einer signifikanten Zunahme der Enzymaktivität bei den reiferen Kindern.

Abb.9a: Enzymquotienten <30 vs. >30 SSW





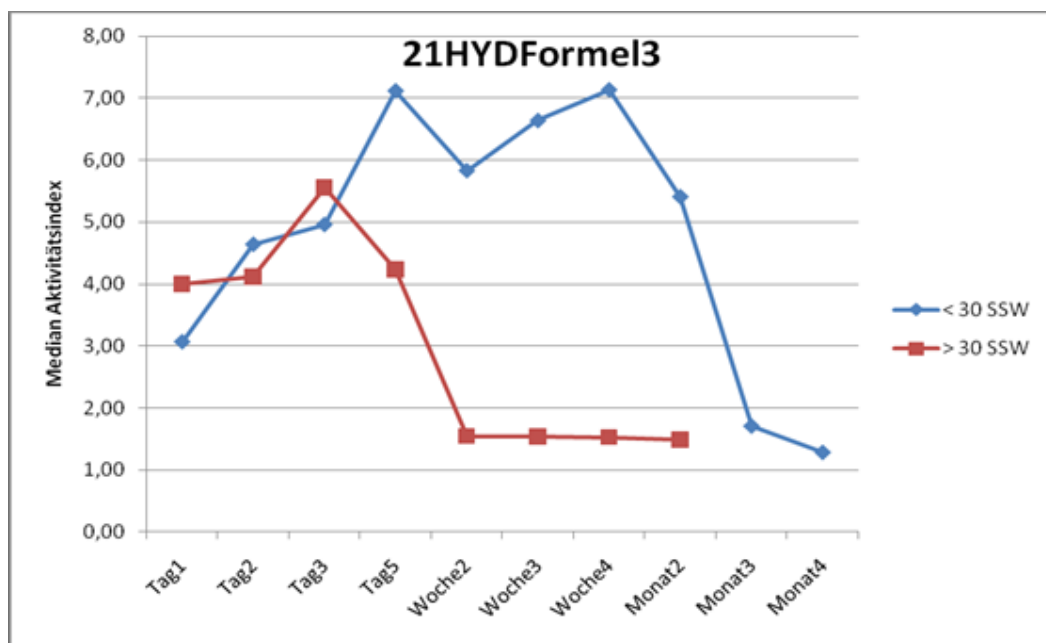
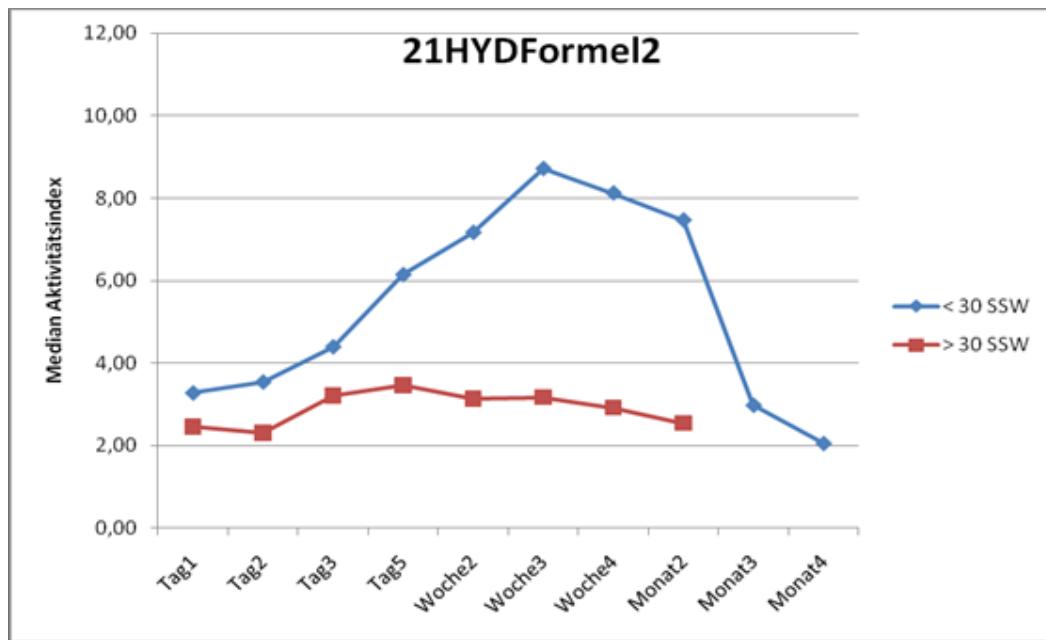
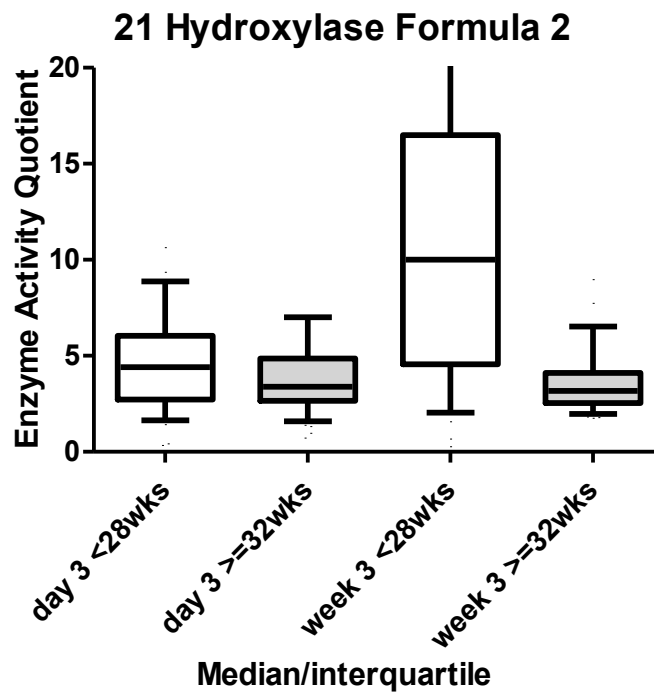
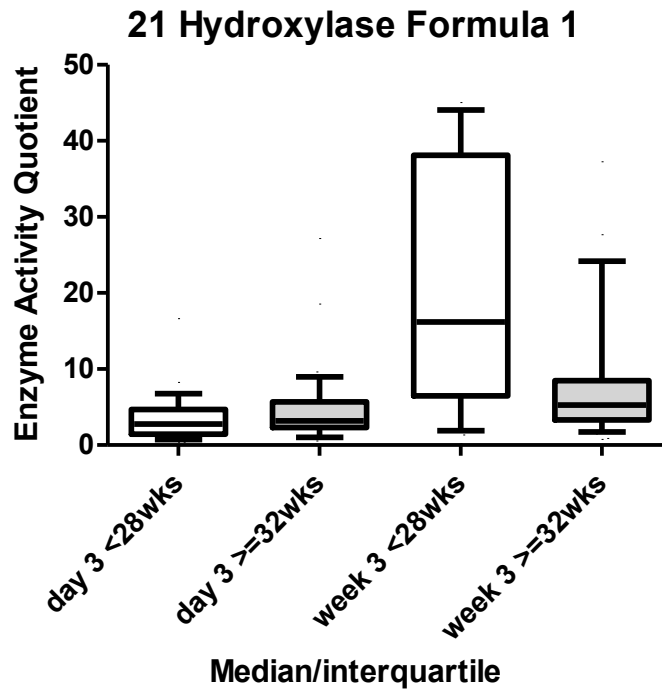


Abb. 9b gibt die Mediane der Veränderungen an Tag 3 bzw. Woche 3 abhängig von den Gruppen < 28 SSW und > 32 SSW wieder. Abb. 9c zeigt die Verteilung der Differenzen.

Abb.9b: Enzymquotienten zu den Zeitpunkten Tag3 und Woche3



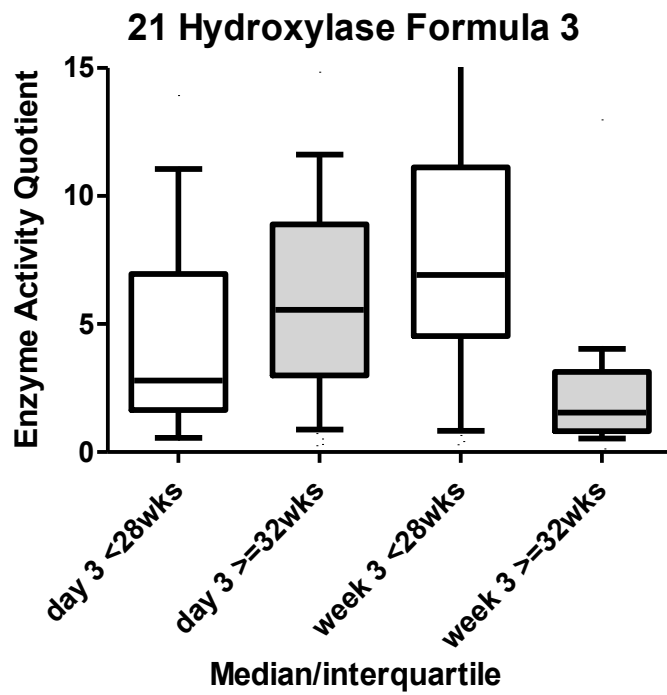
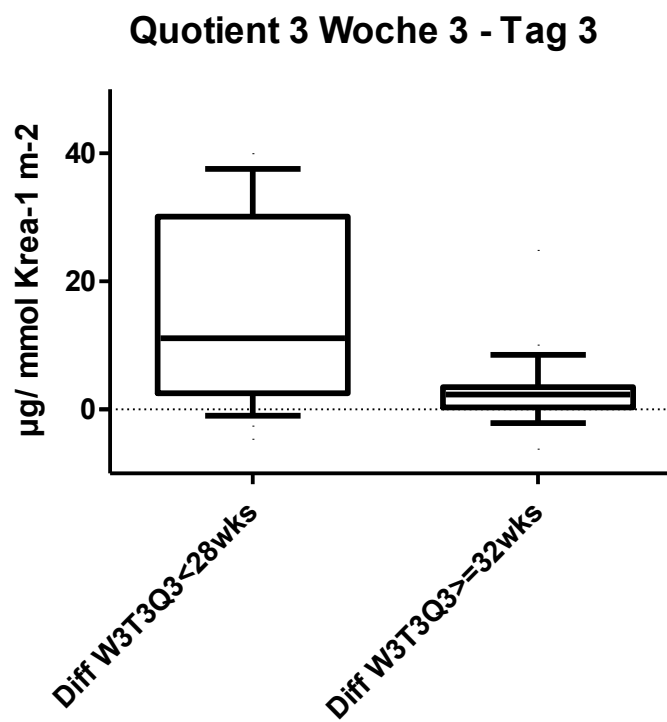
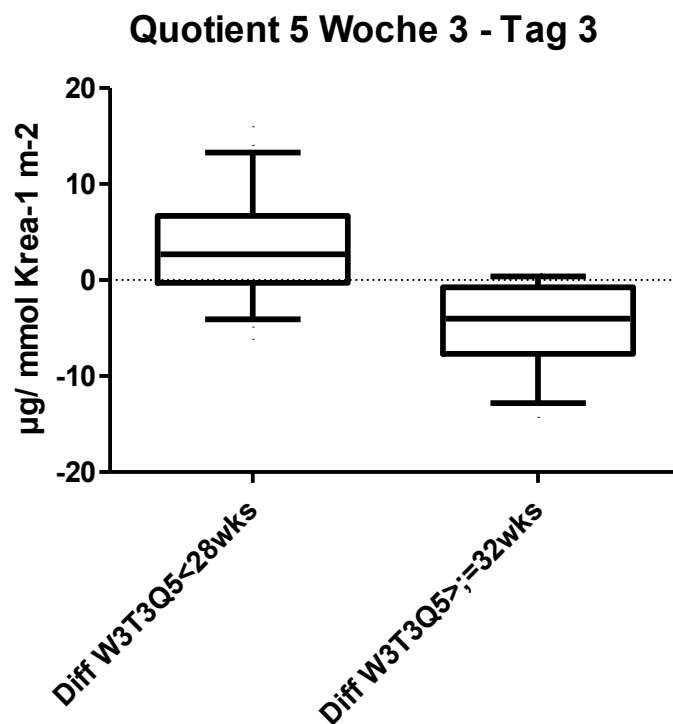
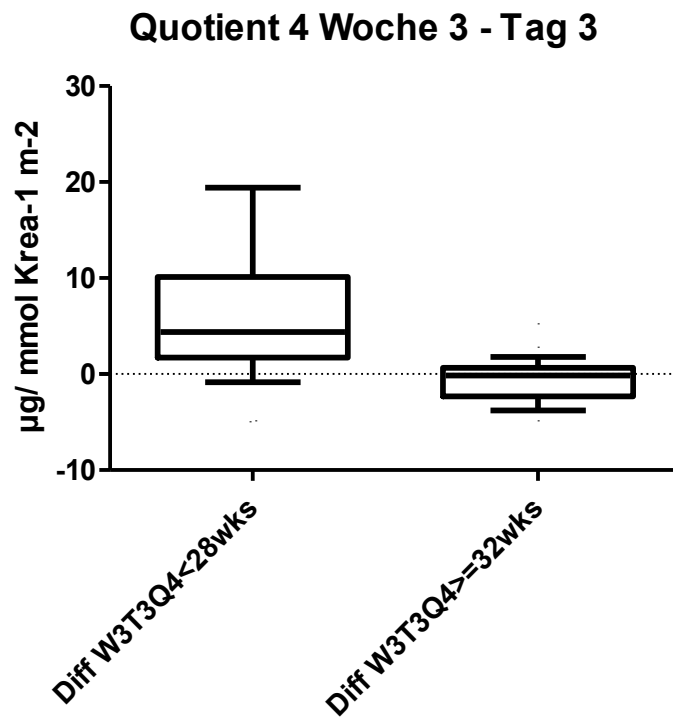


Abb.9c: Differenzen der Enzymaktivität zwischen Tag3 und Woche3





Eine Wechselwirkung der Einflüsse von Gestationsalter und Zeitpunkt fand sich in allen zur Berechnung benutzten Formeln ( $p_{\text{Zeit} \times \text{Gruppe}} < 0,001$ ) im Sinne einer stärkeren Abnahme der Enzymaktivität bei den FG > 30 SSW.

### 11 $\beta$ -Hydroxylase:

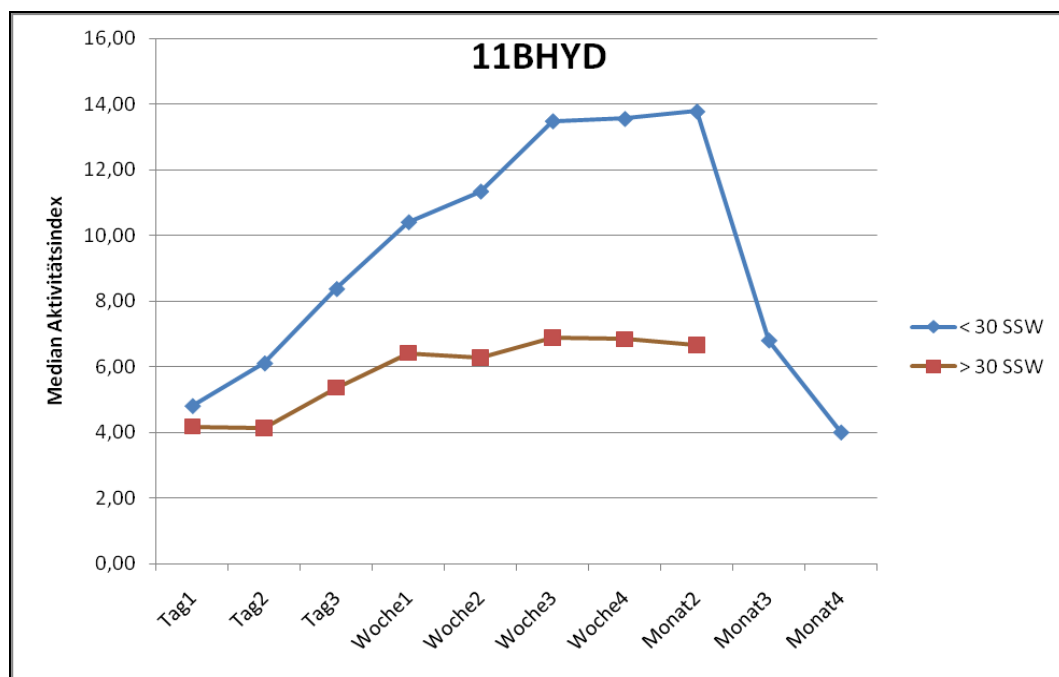
Dieses Enzym katalysiert den letzten Schritt der Cortisolbiosynthese und ist auch in die Biosynthese der Mineralocorticoide involviert. Es ist ein zentrales Enzym im Rahmen der adrenalen Stressantwort.

Abb. 10a zeigt den Verlauf.

Auch hier verhält sich der Quotient umgekehrt proportional zur Enzymaktivität.

Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der Enzymaktivität ab der ersten Lebenswoche ausschließlich bei den unreifen Frühgeborenen < 30 Wochen, wobei die Aktivität unmittelbar postnatal auf dem gleichen Niveau wie das der reiferen Frühgeborenen lag.

Abb.10a: Enzymquotienten <30 vs. >30 SSW



Im Rahmen der zweifaktoriellen Varianzanalyse fand sich nur bei Betrachtung der Gestationsaltergruppen ein Unterschied ( $p_{\text{Gruppe}}=0,005$ ) im Sinne einer vom postnatalen Alter unabhängigen niedrigeren relativen Enzymaktivität bei FG < 30 SSW. Eine Wechselwirkung zwischen SSW und Zeitpunkt zeigte sich nicht ( $p_{\text{Zeit} \times \text{Gruppe}}=0,389$ ).

Abb. 10b gibt die Mediane der Veränderungen an Tag 3 bzw. Woche 3 abhängig vom Gestationsalter wieder. Abb. 10c zeigt die Verteilung der Differenzen.

Abb.10b: Enzymquotienten zu den Zeitpunkten Tag3 und Woche3

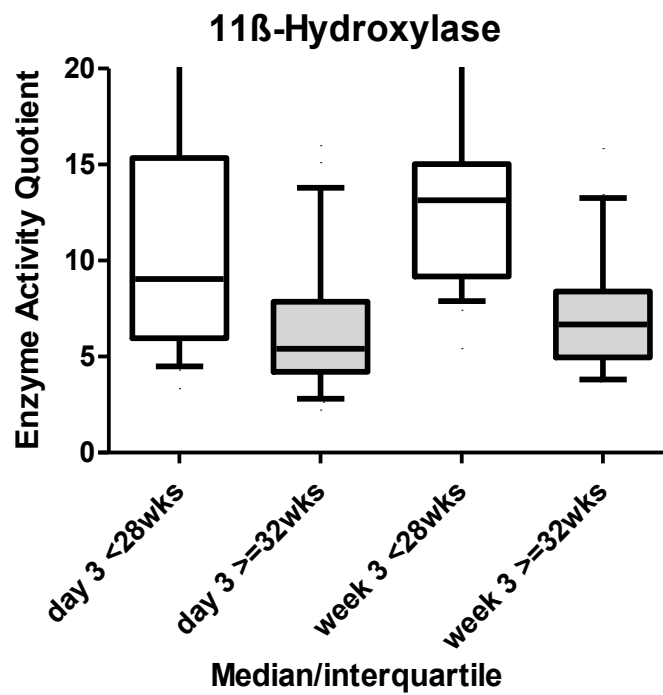
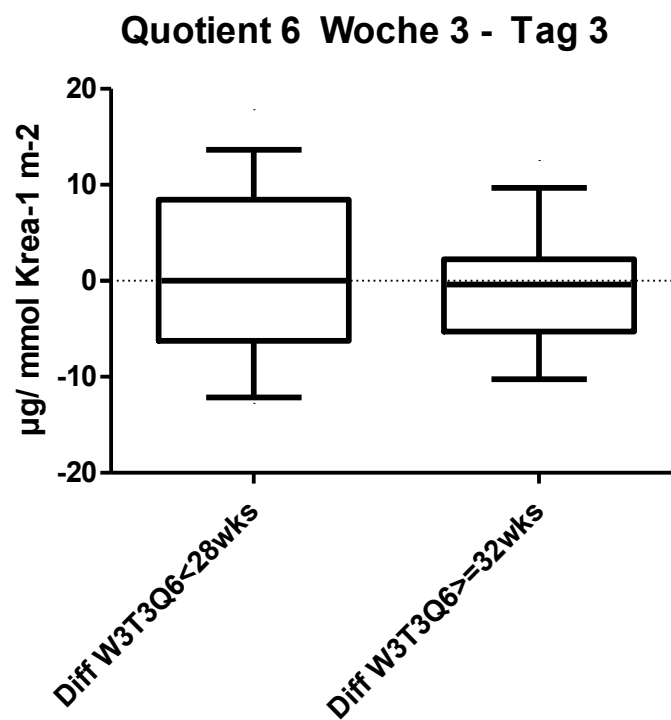


Abb.10c: Differenzen der Enzymaktivität zwischen Tag3 und Woche3



### 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase:

Die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ II baut das biologisch aktive Cortisol in das biologisch inaktive Cortison ab.

Der Quotient der Summen der Cortisol - (11-Hydroxy) zu den Summen der Cortison - (11-Keto) Metabolite wurde zur Beschreibung der relativen Enzymaktivität der 11 $\beta$ -HSD gebildet. Je größer der Quotient umso höher liegt die Konzentration der Cortisolmetabolite.

Abb. 11a zeigt die jeweiligen zeitlichen Verläufe.

Der Quotient liegt bei den unreifen Frühgeborenen im Sinne einer Verschiebung zu den Cortisolmetaboliten an den Tagen 2 und 3 höher als bei den reiferen Frühgeborenen > 30 Wochen. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einem Abfall des Quotienten auf das Niveau der reiferen Kinder.

Abb.11a: Enzymquotienten <30 vs. >30 SSW

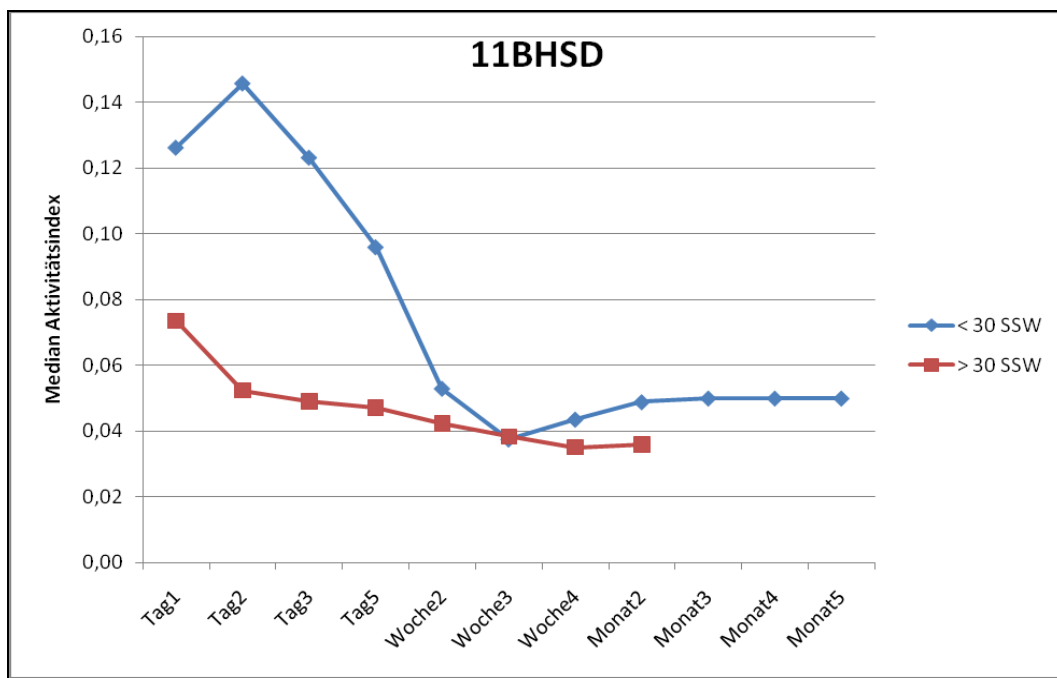


Abb. 11b bildet den Verlauf der Aktivität der 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase abhängig von SSW und Zeitpunkt der Messung ab. Eine Wechselwirkung konnte gefunden werden ( $p_{\text{Zeit} \times \text{Gruppe}} < 0,001$ ). Abb. 11c gibt die Differenzen wieder.

Abb.11b: Enzymquotienten zu den Zeitpunkten Tag3 und Woche3

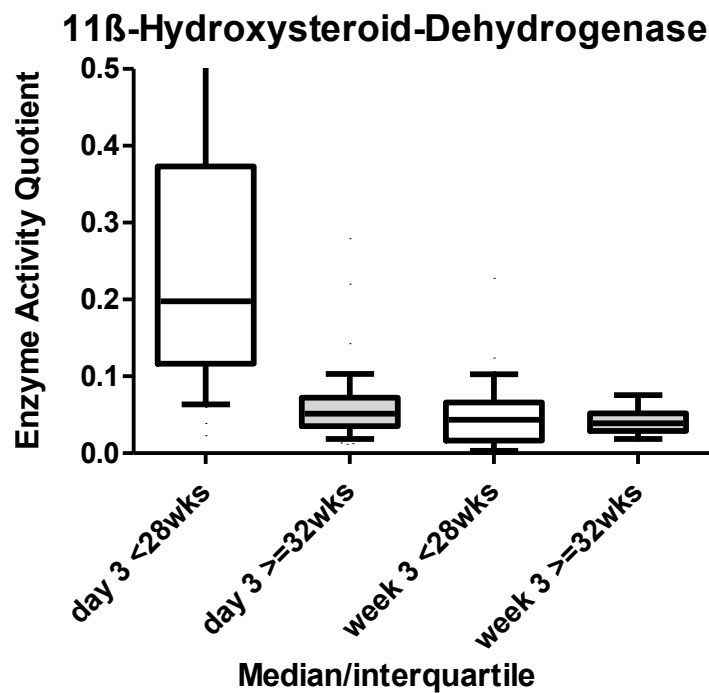
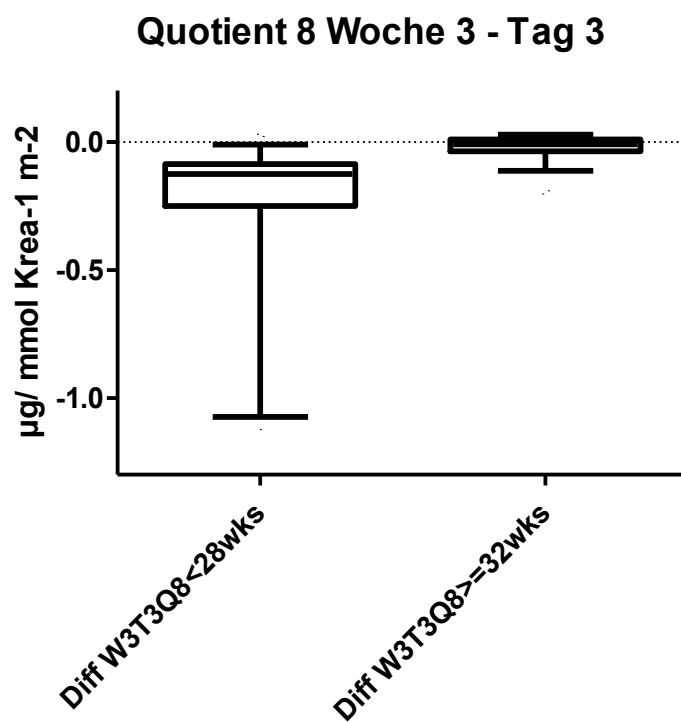


Abb.11c: Differenzen der Enzymaktivität zwischen Tag3 und Woche3





Tab.7 gibt eine Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Abhängigkeitsprüfung der jeweiligen Enzymaktivität von SSW und Zeitpunkt der Messung postnatal.

Tab.7: Zusammenfassung der zweifaktoriellen Varianzanalyse

Quotient	Enzym	p <sub>Zeit x Gruppe</sub> (postnatales Alter)	p <sub>Gruppe</sub> (Gestationsalter)	p <sub>Zeit x Gruppe</sub> (Wechselwirkung)
Q1	17HYD	0,211	0,611	0,131
Q2	3BHSD	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,007</b>	<b>0,019</b>
Q3	21HYD Formel 1	<b>&lt; 0,001</b>	<b>0,005</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Q4	21HYD Formel 2	0,013	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Q5	21HYD Formel 3	0,210	<b>0,024</b>	<b>&lt; 0,001</b>
Q6	11BHYD	0,566	<b>0,005</b>	0,389
Q8	11BHSD	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>	<b>&lt; 0,001</b>

#### 4.3) Einfluss von Erkrankung auf die Enzymaktivität

Ein Einfluss von Erkrankung auf die jeweiligen Enzymaktivitäten konnte nicht gezeigt werden (siehe Methoden „Statistik“ und Punkt 4) im Anhang).

## 5) Diskussion

### 5.1) Patientenkollektiv

Zu dieser Studie konnten 140 Frühgeborene zusammengefasst werden, deren Gestationsalter bei Entbindung das gesamte Spektrum der Frühgeburtlichkeit abdecken (23. – 36. SSW). In den meisten bisher veröffentlichten Untersuchungen wurden Frühgeborene > 30 SSW beobachtet [30]. Ein ähnlich großes Kollektiv (zwischen 24 und 36 SSW (n=120)) untersuchten *Scott et al.* [24]. Dabei wurden Plasmacortisolspiegel, aber keine weiteren Steroidmetabolite bestimmt. Bei der „very low birth weight“ – Gruppe wurden direkt postnatal die höchsten Cortisolspiegel gemessen. Diese sehr unreifen Frühgeborenen sind in besonderer Weise postnatalen Stress ausgesetzt. Eine Untersuchung dieser Patientengruppe erscheint im Hinblick auf die Unreife der NNR daher besonders interessant.

Der Untersuchungszeitraum, in dem die Probanden longitudinal beobachtet wurden, betrug in unserer Studie zwei Monate. Viele Veröffentlichungen befassten sich nur mit der ersten Lebenswoche [24, 30, 56]. Die Veränderung der Cortisolexkretion und Zunahme der Enzymaktivität der Steroidbiosynthese in den folgenden Wochen ist von Interesse, da in diesem Zeitraum die Umbauvorgänge in der NNR stattfinden [18] und die anfänglich bestandenen Stresssituationen und neonatalen Erkrankungen behandelt wurden. *Wittekind et al.* [57] bestimmten die Plasma - ACTH - und Cortisolspiegel über einen Zeitraum von acht Wochen und konnten eine signifikante Abnahme der Level bis zur achten Lebenswoche feststellen.

Viele bisher veröffentlichte Untersuchungen zeigten, dass v.a. neonatale Erkrankungen und damit verbundene Komplikationen die Stressantwort der Frühgeborenen verändern. Bisher wurde aber keine einheitliche Definition vom Schweregrad der Erkrankung verwendet [24, 57]. Die Verwendung von Scores [39, 58] zur Objektivierung hat sich etabliert. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Einteilung der Frühgeborenen in zwei Gruppen. Da Frühgeburtlichkeit kein physiologischer Zustand ist, wurden alle Probanden, die nach weiter o.g. Kriterien nicht in die Gruppe der „kranken“ („ill“) Frühgeborenen gehören, in die Gruppe der „wenig beeinträchtigten“ („well“) Frühgeborenen zugeordnet. Der außerdem angewandte SNAP umfasst mehrere (patho)-physiologische Variablen, die gut mit der Morbidität der Säuglinge korrelieren. Die Häufigkeit neonataler Erkrankungen war in der Gruppe der „kranken“ Frühgeborenen

erwartungsgemäß signifikant erhöht. Auch die SNAP Werte waren v.a. in der ersten Lebenswoche signifikant zwischen den Gruppen unterschiedlich.

Zusammenfassend wurde in dieser Studie erstmals eine sehr große, das gesamte Gestationsalterspektrum umfassende Population Frühgeborener, die detailliert anhand prospektiv erhobener klinischer Parameter charakterisiert wurden, bezüglich ihres Steroidmetaboloms longitudinal untersucht.

## **5.2) Methodik**

### **5.2.1) Uringewinnung**

Bei jedem Probanden wurde im Untersuchungszeitraum bis zu acht Mal ein 24-h-Urin gewonnen. Zirkadiane Schwankungen in der Exkretion wurden damit als mögliche Fehlerquellen ausgeschlossen. Eine Steroideinzelmessung im Plasma, wie sie bisher häufig durchgeführt wurde [24, 56, 59], repräsentiert nicht die Cortisolproduktionsrate [60]. Durch Messung der Glukokortikoidmetabolite und der fetalen Steroide im Urin ist eine bessere Aussage über die adrenale Funktion zu machen [61]. *Kraan et al.* [62] zeigten, dass bei Erwachsenen die Summe der nicht invasiv, mittels 24-h-Urin gemessenen Glukokortikoidmetabolite 75% der invasiv bestimmten Cortisolproduktionsrate entspricht.

Der Urin wurde mit Hilfe von Einmalwindeln [40] gesammelt und mittels einer Hydraulikpresse ausgepresst [34], dabei konnten Rückgewinnungsraten von über 90% gezeigt werden. Die Bestimmung der Steroidmetabolite im Urin [25] erfolgte mittels Gaschromatographie – Massenspektrometrie. So stand eine etablierte Methodik zur Verfügung, die obwohl sie nicht invasiv ist, eine hohe Genauigkeit und Selektivität (keine Kreuzreaktionen) zur Bestimmung einzelner Steroidmetabolite aufweist.

### **5.2.2) Quotientenbildung**

Durch o.g. Verfahren wurden verschiedene Glucocorticoid – und Fetalzonensteroid – Metabolite bestimmt (siehe 3.2.2). *Caulfield et al* [35] beschrieben entsprechende Quotienten aus Steroidmetaboliten im Urin zur Bestimmung der Enzymaktivität. Diese Quotienten sind relativer Ausdruck der Enzymaktivität. Gegenstand der Dissertation sind die beiden Schlüsselenzyme der fetoplazentaren Einheit ( $3\beta$ -HSD,  $17\alpha$ -HYD), das klassische Enzym des adrenogenitalen Syndroms ( $21$ -HYD), das den letzten Schritt

der Cortisolsynthese katalysierende Enzym (11 $\beta$ -HYD) und das Enzym des Cortisolabbaus (11 $\beta$ -HSD).

### **5.3) Verlauf der Enzymaktivitäten abhängig vom Gestationsalter**

#### 17 $\alpha$ -Hydroxylase:

In der longitudinalen Darstellung fand sich ein Abfall der Enzymaktivität um den Faktor 2 bis 3 zum Ende der ersten Lebenswoche, der in der Gruppe der reiferen Frühgeborenen ausgeprägter war. Ein statistischer Zusammenhang ließ sich in der zweifaktorielle Analyse jedoch nicht zeigen.

Die 17 $\alpha$ -Hydroxylase steht relativ am Anfang der Steroidbiosynthese und ist essentiell zur Bildung von Steroid – und Sexualhormonen. Ein Mangel dieses Enzyms führt zu Hypertension, Hypokaliämie und bei Frauen zu einer primären Amenorrhoe [63]. *Dean et al.* [64] beschreiben einen männlichen Neugeborenen mit 17HYD-Mangel mit den klinischen Zeichen eines Mikropenis und Hypospadie.

Die in den Voruntersuchungen gemessenen Cortisolproduktionsraten und das Fehlen von Symptomen wie Hypertension und Hypokaliämie bei den Frühgeborenen sprechen für eine normale Funktion des Enzyms postnatal. Der Abfall der Enzymaktivität folgt dem Rückgang der Krankheitsaktivität vor allem bei den unreifen Frühgeborenen (s. Abb. 7a). Zum Vergleich mit dem postnatalen Verlauf der einzelnen Enzyme der Steroidbiosynthese zeigen die Abbildungen 12 und 13 die in der Literatur berichteten Cortisolproduktionsraten und die Schwere der Erkrankung gemessen in SNAP bei Frühgeborenen < 30 und > 30 Gestationswochen. Demzufolge entspricht der Abfall nach der ersten Lebenswoche nicht dem Abfall der Cortisolproduktion, der erst mit dem Wachstum der Kinder nach den ersten 3-4 Lebenswochen einsetzt und bei den unreiferen Frühgeborenen deutlicher ausgeprägt ist.

Abb. 12: Cortisolproduktionsraten, Schwere der Erkrankung gemessen in SNAP und Gewichtszunahme (Median; Quartile) bei kranken (□) und gesunden (■) Frühgeborenen < 30 Wochen im postnatalen Verlauf (nach Heckmann et al 2005)

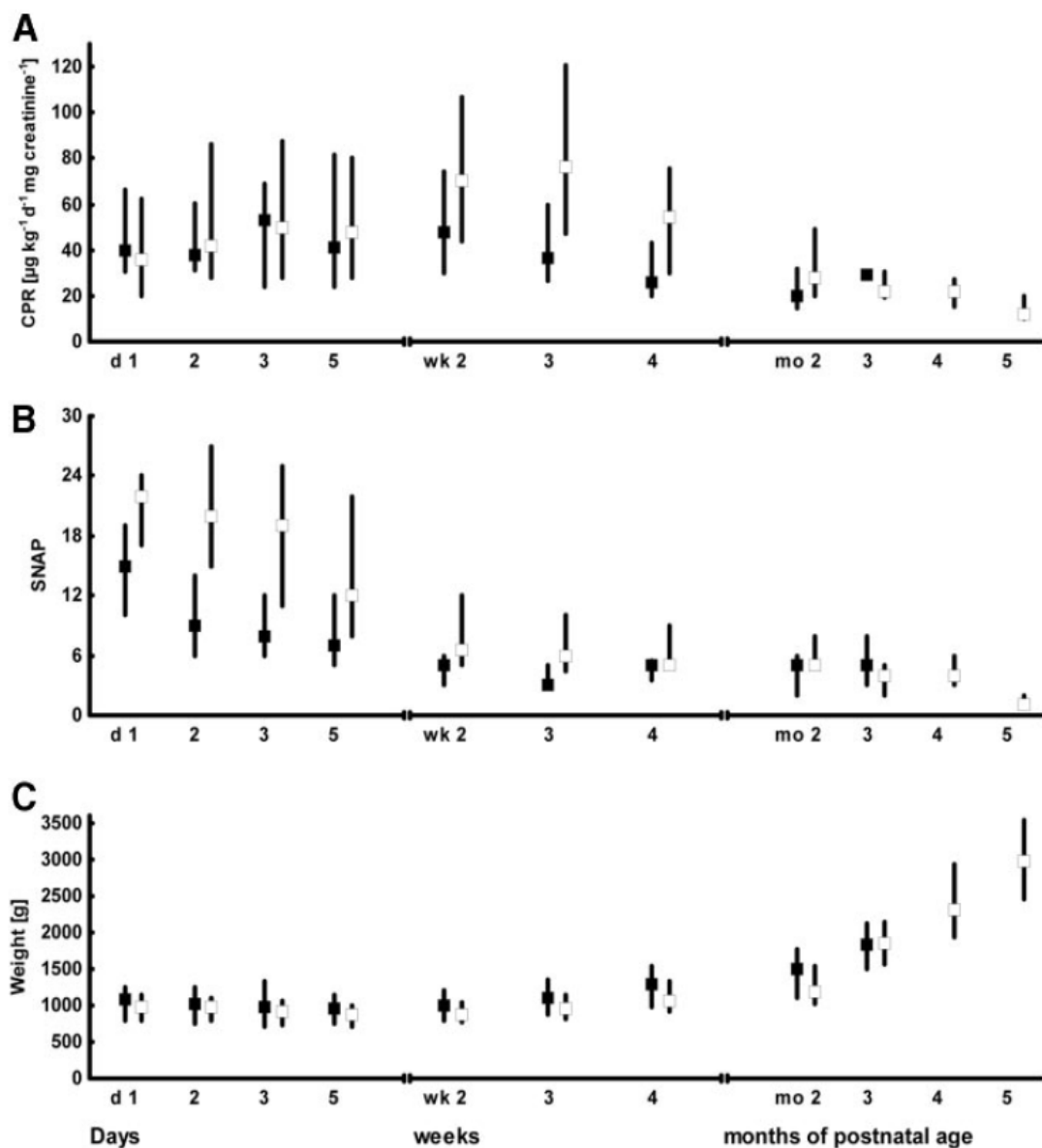
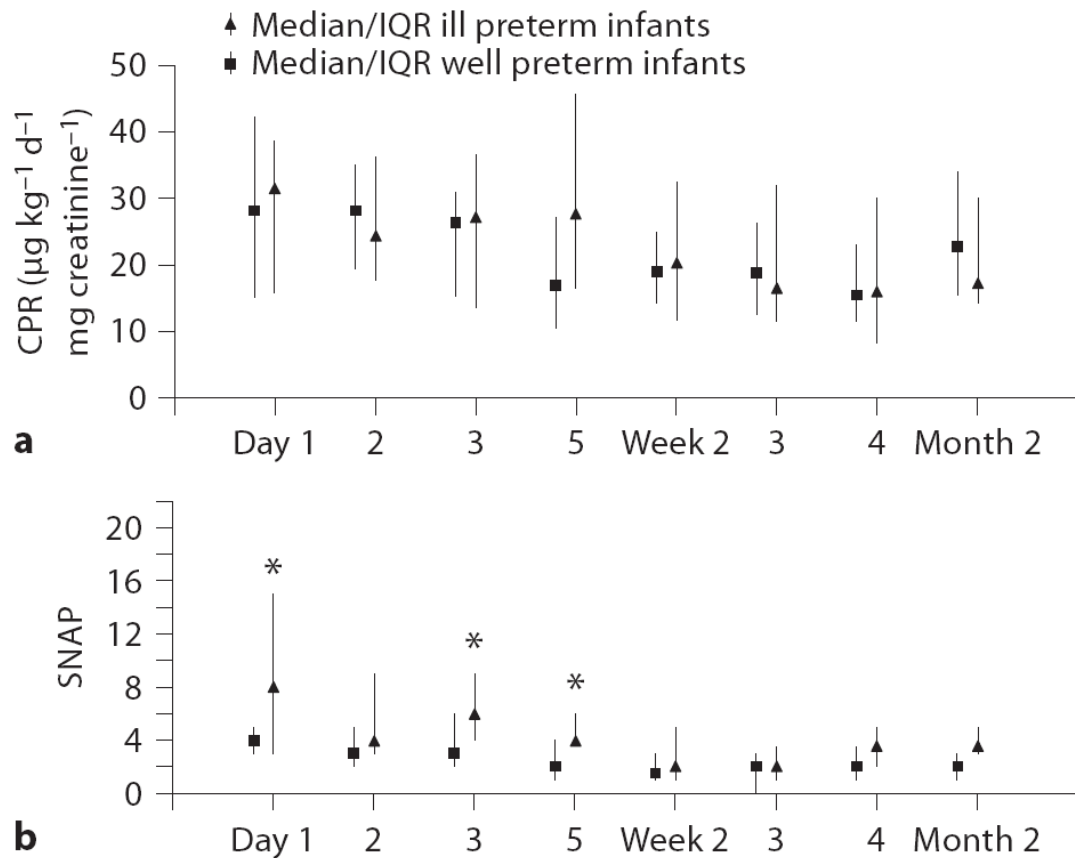


Abb. 13: Cortisolproduktionsraten und Schwere der Erkrankung gemessen in SNAP (Median; Quartile) bei kranken und gesunden Frühgeborenen > 30 Wochen im post-natalen Verlauf (nach Grofer et al 2010)



### 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase:

Es zeigt sich eine Zunahme der Enzymaktivität vom Ende der ersten Lebenswoche zur dritten Woche bei den unreifen Frühgeborenen < 30 Gestationswochen. Bei den reiferen Frühgeborenen > 30 Wochen fand sich diese Änderung nicht. Dies konnte in der zweifaktoriellen Analyse ebenfalls gezeigt werden.

Auch die Funktion der 3 $\beta$ HSD ist für die sexuelle Differenzierung von Bedeutung [13]. *Jadot et al.* [65] berichten in einem Case-Report von den klinischen Zeichen eines intersexuellen Genitales aufgrund eines 3 $\beta$ HSD-Mangels. *Wolthers et al.* [66] konnten die Diagnose dieses Defektes über die Bestimmung der Metabolite stellen.

Unsere Ergebnisse passen zu dem Wissen, dass das Enzym intrauterin in der Fetalzone kaum synthetisiert wird [67, 68], es entstehen Fetalzonensteroid (DHEAS). Unsere Untersuchungen zeigen, dass auch sehr unreife Frühgeborene postnatal die 3 $\beta$ HSD hoch regulieren können und so zur Cortisolsynthese außerhalb der fetoplazentaren Einheit in der Lage sind. Allerdings scheint gegenüber den reiferen Frühgeborenen diese Aktivitätszunahme um die erste Lebenswoche verzögert zu sein.

*Nykänen et al.* [45] fanden durch Messung von Glucocorticoidmetaboliten im Serum ebenfalls keine Unreife der 3 $\beta$ -HSD-Aktivität bei Frühgeborenen. Im Untersuchungszeitraum, der sich allerdings nur auf die ersten vier Tage postnatal erstreckte, konnten sie keinen Unterschied in der Enzymaktivität zwischen sehr unreifen (< 28 SSW) und reiferen (> 28 SSW) Frühgeborenen aufzeigen. Auch die Untersuchungen von *Hingre et al.* [9] konnten keine Reduktion der 3 $\beta$ -HSD-Aktivität bei extrem Frühgeborenen (< 30 SSW) nachweisen.

Neuere Arbeiten konnten zudem zeigen, dass eine ACTH - abhängige Stimulation der 3 $\beta$ -HSD Typ 2 in der 8. - 9. Schwangerschaftswoche nachzuweisen ist und somit der Embryo während dieser Periode zur de novo Cortisolsynthese in der Lage ist [13]. Zweck dieser transienten 3 $\beta$ -HSD2-Expression ist jedoch die Modulation der Androgenwirkung durch Cortisol bei der sexuellen Entwicklung des Embryos.

#### 21-Hydroxylase:

Bei allen zur Berechnung genutzter Formeln zeigt sich bei den sehr unreifen Frühgeborenen < 30 Wochen ein ähnlicher longitudinaler Verlauf mit einer Abnahme der relativen Enzymaktivität ab dem Ende der ersten Lebenswoche. Bei den Frühgeborenen > 30 Wochen ist das Bild inhomogener (siehe Abb.9a). Im Rahmen der statistischen Auswertung fand sich bei allen Betrachtungen eine deutliche Wechselwirkung zwischen Gestationsalter und Zeitpunkt der Messwerte. Liegt eine Wechselwirkung vor, sind die globalen Einflüsse nicht mehr wichtig.

Die 21HYD ist für die Synthese der Cortico – und Mineralocorticoide essentiell, ein Mangel mündet in das adrenogenitale Syndrom [69] mit einem Überangebot an Sexualhormonen. Es kommt zur Virilisierung des weiblichen Geschlechts sowie ggf. zu schockähnlichen Zuständen mit Elektrolytentgleisungen. Die Diagnose erfolgt über die Bestimmung des 17-OH-Progesterons, das Substrat des Enzyms. Besonders bei sehr unreifen Frühgeborenen sind die Werte in den ersten Lebenstagen häufig er-

hört, es besteht nicht selten eine Klitorishypertrophie. Die Werte fallen im Verlauf in normale Dimensionen. Die Abnahme der Enzymaktivität folgt der Abnahme des Krankheitstresses. Bei unreiferen Frühgeborenen ist analog der Abnahme des Krankheitstresses als auch der Cortisolproduktionsraten der Abfall der relativen Enzymaktivität der 21HYD deutlich ausgeprägter (siehe Abb. 9b). *Shackleton et al.* [70] konnten belegen, dass ein Mangel an 21HYD auch über die erhöhte Ausscheidung von Fetalzonensteroiden in der ersten Lebenswoche diagnostiziert werden kann. Ob dies bei unreifen Frühgeborenen mit ihren extrem hohen Ausscheidungsraten fetaler Steroide [33, 60] möglich ist, ist nicht bekannt.

#### 11 $\beta$ -Hydroxylase:

Es zeigt sich eine deutliche Abnahme der relativen Enzymaktivität ab der ersten Lebenswoche ausschließlich bei den unreifen Frühgeborenen < 30 Wochen, wobei die Aktivität unmittelbar postnatal auf dem gleichen Niveau wie die reiferen Frühgeborenen lag. Eine Zunahme der Aktivität während des fetalen Wachstums ist anzunehmen [9]. Die globale Abhängigkeit der Aktivität vom Gestationsalter unabhängig vom postnatalen Alter konnte statistisch nachgewiesen werden.

Die 11 $\beta$ HYD katalysiert den letzten Schritt der Cortisolsynthese. Unsere Ergebnisse lassen sich mit der Annahme erklären, dass v.a. die sehr unreifen Säuglinge in den ersten Lebenstagen immensem Stress ausgesetzt sind und dieser im weiteren Verlauf, auch durch die Behandlung neonataler Erkrankungen, abnimmt. Entsprechend ist eine Mehrsynthese des Cortisols als „Stresshormon“ nicht mehr notwendig. Der Verlauf entspricht den anderen Steroidbiosyntheseenzymen bis auf den der 3 $\beta$ HSD. Eine Virilisierung des weiblichen Geschlechts kann auch in einem Mangel dieses Enzyms begründet sein [71, 72].

#### 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase:

Bei der longitudinalen Betrachtung liegt der Quotient bei den unreifen Frühgeborenen im Sinne einer Verschiebung zu den aktiven Cortisolmetaboliten an den Tagen 2 und 3 höher als bei den reiferen Frühgeborenen > 30 Wochen. Im weiteren postnatalen Alter kommt es zu einem Niveauangleich bis zur zweiten Lebenswoche. In der zweifaktoriellen Varianzanalyse konnte die Wechselwirkung der Einflussgrößen nachgewiesen werden.



Intrauterin wird das biologisch aktive Cortisol zu fast 80% in das biologisch inaktive Cortison umgewandelt [15, 73]. So wurden in verschiedenen Studien Plasmacortisolspiegel beim Feten um den Faktor 5-10 niedriger als postnatal gemessen [74, 75]. Diese Inaktivierung dient dem Schutz des Feten vor den katabolen Wirkungen des Hormons. Postnatal findet sich eine Reduktion der Cortisolinaktivierung, um aktives Stresshormon zur Verfügung zu stellen. Bei den unreiferen und deutlich kränkeren Frühgeborenen lässt sich sogar eine Verschiebung zu den aktiven Cortisolmetaboliten in der Phase der höchsten Krankheitsaktivität beobachten. Dies konnte auch bei erwachsenen Patienten nach herzchirurgischem Eingriff nachgewiesen werden [76].

#### **5.4) Einfluss von Erkrankung auf die Enzymaktivität**

In beiden Gestationsaltergruppen konnte die statistische Analyse keinen Einfluss der Schwere der Erkrankung auf die Enzymaktivität nachweisen (siehe Punkt 4) im Anhang). Dies bestätigen auch Voruntersuchungen von *Heckmann et al.*, die mit GC-MS bei Plasmacortisol Einzelwerten [34, 38] keine Korrelation zur Erkrankungsschwere bei Frühgeborenen < 30 SSW erkennen ließen. Bei reiferen Frühgeborenen (> 30 SSW) konnten *Grofer et al* allerdings einen signifikanten Zusammenhang zwischen Krankheitsschwere und Cortisolproduktion zeigen [31]. Dieser Effekt war jedoch gering ausgeprägt, was erklären könnte, dass bei Betrachtung einzelner Metabolite bei deutlich geringerem Stress in der Gruppe der reiferen Frühgeborenen ein Effekt nicht entdeckt werden konnte.

Tabelle 8 fasst die postnatale Dynamik der Enzymaktivitäten in Abhängigkeit vom Gestationsalter innerhalb der definierten Zeitpunkte (3. Lebenstag zur 3. Lebenswoche) und deren mögliche Interpretation „auf einen Blick“ zusammen. Die globalen Effekte der Einflussgrößen und deren Wechselwirkung untereinander wurden geprüft.

Tab.8: Zusammenfassung des deskriptiven postnatalen Verlaufs (3. Lebenstag zur 3. Lebenswoche) der relativen Enzymaktivitäten der Steroidbiosynthese bei sehr unreifen Frühgeborenen und reiferen Frühgeborenen und Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse

<sup>5</sup> Enzym	unreif	reif	Statistischer Effekt	Mögliche Interpretation
<b>17<math>\alpha</math>-HYD</b>	Abnahme	Abnahme	Keiner	Abnahme der Enzymaktivität parallel zur Abnahme der Krankheitsintensität.
<b>3<math>\beta</math>-HSD</b>	Zunahme	Keine Änderung	Wechselwirkung von SSW und Zeitpunkt	Verzögerte Zunahme dieses im 2. Trimester noch intrauterin herunterregulierten Enzyms bei den unreifen Frühgeborenen.
<b>21-HYD</b> <b>Formel 1</b>	Abnahme	Abnahme	Wechselwirkung von SSW und Zeitpunkt	Abnahme der Enzymaktivität bei unreifen Frühgeborenen stärker als bei reiferen FG parallel zur Abnahme der Krankheitsintensität
<b>21-HYD</b> <b>Formel 2</b>	Abnahme	Keine Änderung	Wechselwirkung von SSW und Zeitpunkt	Abnahme der Enzymaktivität parallel zur Abnahme der Krankheitsintensität bei den unreifen Frühgeborenen
<b>21-HYD</b> <b>Formel 3</b>	Abnahme	Zunahme	Wechselwirkung von SSW und Zeitpunkt	Abnahme der Enzymaktivität parallel zur Abnahme der Krankheitsintensität nur bei unreiferen FG
<b>11<math>\beta</math>-HYD</b>	Abnahme	Keine Änderung	Globaler Einfluss von SSW.	Niedrigeres relatives Aktivitätsniveau bei unreiferen FG im Vergleich zu den reiferen FG
<b>11<math>\beta</math>-HSD</b>	Zunahme	Zunahme	Wechselwirkung von SSW und Zeitpunkt	Verschiebung zu Cortisolmetaboliten an Tag 3 (Phase höhere Krankheitsstress) bei den unreifen FG verglichen zu reiferen FG und zu Woche 3

## 5.5) Limitationen der Untersuchung

Die Urinmetabolite des Steroidstoffwechsels stellen Abbauprodukte der an der Biosynthese der Steroide beteiligten Metabolite dar. Die gesamte Komplexität des Stoffwechsels lässt sich anhand einzelner Enzymquotienten daher nur bedingt abbilden. Die Quotientenbildung (und Summenbildung) führt mindestens zu einer Addition der Streuung der Einzelmetabolite. Statistische Zusammenhänge bei Betrachtung der Einzelmetabolite können so abgeschwächt oder verloren gehen. Auch bei der Diagnostik von angeborenen Störungen der Steroidbiosynthese (z.B. Adrenogenitales Syndrom) ist die Diagnostik zum Teil nur bei gleichzeitiger Betrachtung von (teilweise mehreren) Quotienten und von Einzelmetaboliten möglich [35]. Die zusätzliche Betrachtung der Metabolite im Blut und der Expression der die Steroidbiosynthese regulierenden Gene könnte ein genaueres Bild zeichnen. Allerdings ist bei Patienten mit einem Gewicht zwischen 500 und 2500 g die Verfügbarkeit biologischen Untersuchungsmaterials nicht nur aus ethischen Gründen limitiert. Ein Kind mit einem Gewicht von 500 g hat ein Blutvolumen von ca. 40ml.

## 5.6) Fazit

Zusammenfassend zeigt sich eine Abnahme der Enzymaktivität vieler Schlüsselenzyme der Steroidbiosynthese, besonders ausgeprägt bei Frühgeborenen < 30 Wochen parallel zur Abnahme der Krankheitsintensität und der notwendigen „Stressantwort“. Teilweise finden die Niveauunterschiede bei den Enzymen zwischen reiferen und sehr unreifen Frühgeborenen ihre Entsprechung in den deutlich höheren Cortisolproduktionsraten bei den unreiferen Frühgeborenen. Dies spricht für eine generelle Aktivierung der adrenalen Steroidbiosynthese. In beiden Gruppen bleiben die Cortisolproduktionsraten jedoch länger erhöht als dies die Enzymaktivität vermuten lässt. Ein möglicher Erklärungsansatz könnte die Metabolitenauswahl in den Quotienten sein, die ja nur einen kleinen Teil der 14 Metabolite ausmachen, die in die Berechnung der Cortisolproduktionsraten eingingen [25], [31].

Hervorzuheben ist, dass besonders die unreiferen und damit deutlich kränkeren FG < 30 SSW in der Phase höchster neonataler Morbidität über eine funktionierende Cortisolbiosynthese verfügen. Dies war aufgrund der fetalen Physiologie (insbesondere Mangel an 3 $\beta$ -HSD) nicht zu vermuten, deckt sich aber mit den Arbeiten von *Hingre et al.* [9] und *Nykänen et al.* [45]. Auch die Verschiebung zu aktiven Cortisolmetaboliten

in den ersten Lebenstagen bei sehr unreifen Frühgeborenen im Vergleich zu reiferen Frühgeborenen deckt die These einer funktionierenden „Stressantwort“ auch bei den extrem Frühgeborenen.

Im Gegensatz zu o.g. Veröffentlichungen, die Enzymsubstrate bzw. -Produkte im Serum der Kinder gemessen haben, konnte die Funktionsfähigkeit der Steroidbiosynthese bei unreifen Frühgeborenen in dieser Dissertation erstmals anhand der relativen Enzymaktivitäten durch die nicht invasive Messung der Glucocorticoidmetabolite im Urin gezeigt werden.

## 6) Zusammenfassung

Einleitung: Intrauterin bilden die fetale Nebennierenrinde und die maternale Plazenta eine funktionelle Einheit zur Produktion fetaler Steroidhormone. Die Bildung dieser Hormone ist für die Reifung fetaler Organsysteme und die intrauterine Homöostase essentiell. Die Unreife des Enzymsystems der Steroidbiosynthese wird als Ursache einer adrenalen Insuffizienz Frühgeborener vermutet. Aufgrund der fehlenden Aktivität eines der Schlüsselenzyme, der 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, ist der Fetus auf mütterliches Progesteron als Substrat der Glukokortikoid – und Mineralocorticoidsynthese angewiesen. An der Cortisolsynthese sind außerdem die 17 $\alpha$ -Hydroxylase, die 21-Hydroxylase und die 11 $\beta$ -Hydroxylase beteiligt. Ein Mangel an der 21-Hydroxylase führt zum klinischen Vollbild des Adrenogenitalen Syndroms. Die 11 $\beta$ -Hydroxylase katalysiert den letzten Schritt der Cortisolproduktion. Zum Schutz des Feten vor den katabolen Wirkungen des Cortisols erfolgt dessen Neutralisierung in das biologisch inaktive Cortison durch die 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, Typ II. Das Cortisol verhindert außerdem als wichtiger Inhibitor der ACTH-Sekretion eine Überproduktion von Androgenen in der androgen-sensitiven Phase der Geschlechtsentwicklung. Bei Frühgeburtlichkeit wird dieses feine Zusammenspiel der fetoplazentaren Einheit abrupt unterbrochen.

Fragestellung: Charakterisierung des postnatalen Verlaufes der oben genannten, an der Steroidbiosynthese beteiligten Enzyme mittels Bildung von Substrat/Produktquotienten aus Glucocorticoidmetaboliten im Urin in Abhängigkeit von Gestationsalter und neonataler Erkrankung.

Methodik: Die Steroidmetabolite wurden bei insgesamt 140 Frühgeborenen zwischen 23 und 36 Schwangerschaftswochen longitudinal bis zum 2. Lebensmonat mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie im 24h-Sammelurin bestimmt. Anschließend wurden validierte Quotienten (Substrat/Produkt) gebildet, die sich umgekehrt proportional zur Enzymaktivität verhalten. Die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD wurde durch Division der Cortisol – durch die Cortisonmetabolite bestimmt. Die Probanden wurden anhand klinischer Kriterien und Anwendung des „Score for Neonatal Acute Physiology“ in Gruppen „kranker“ („ill“) und „wenig beeinträchtigter“ („well“) Frühgeborener eingeteilt. Durch Anwendung statistischer Tests (modifizierte mehrfaktorielle Vari-

nazanalyse) wurde der Verlauf der Enzymaktivität in Abhängigkeit vom Gestationsalter und Erkrankung untersucht.

Ergebnisse: Kranke Frühgeborene waren signifikant unreifer, hatten ein deutlich niedrigeres Geburtsgewicht und einen im Median um eins niedrigeren 5 Minuten APGAR. Die Häufigkeit neonataler Erkrankungen entsprach der Gruppeneinteilung und war in der Gruppe der „kranken“ Frühgeborenen signifikant höher.

Krankheit hatte keinen Einfluss auf die relative Aktivität der untersuchten Steroidbiosyntheseenzyme.

Die Enzymaktivität der 17 $\alpha$ -Hydroxylase zeigte keinen Unterschied zwischen den Gestationsaltergruppen < 30 SSW und > 30 SSW und im postnatalen Verlauf. Die Aktivitätszunahme der 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase war bei den Frühgeborenen < 30 SSW zwischen der ersten und dritten Lebenswoche am stärksten ( $p < 0,019$  zwischen Tag 3 und Woche 3), bei den Probanden > 30 SSW fand sich keine Änderung. Zur Berechnung der Enzymaktivität der 21-Hydroxylase standen drei Formeln zur Verfügung. Bei den unreiferen Frühgeborenen fand sich eine signifikante Aktivitätsabnahme ab dem Ende der ersten Lebenswoche im Gegensatz zu den reiferen Frühgeborenen ( $p < 0,001$  zwischen Tag 3 und Woche 3). Die Aktivität der 11 $\beta$ -Hydroxylase lag bei unreifen FG < 30 SSW niedriger als bei reiferen Kindern ohne Einfluss des postnatalen Verlaufes ( $p < 0,005$ ). Bei der Betrachtung der 11 $\beta$ -HSD liegt der Quotient bei den unreifen Frühgeborenen im Sinne einer Verschiebung zu den aktiven Cortisolmetaboliten an den Tagen 2 und 3 höher als bei den reiferen Frühgeborenen > 30 Wochen.

Schlussfolgerung: Zusammenfassend zeigt sich eine Abnahme der Enzymaktivität vieler Schlüsselenzyme der Steroidbiosynthese besonders ausgeprägt bei Frühgeborenen < 30 Wochen parallel zur Abnahme der Krankheitsintensität. Teilweise finden die Niveauunterschiede bei den Enzymen zwischen reiferen und sehr unreifen Frühgeborenen ihre Entsprechung in den deutlich höheren Cortisolproduktionsraten bei den unreiferen Frühgeborenen. Deutlich wurde, dass besonders die unreiferen und damit deutlich kränkeren FG < 30 SSW in der Phase höchster neonataler Morbidität über eine funktionierende Cortisolbiosynthese verfügen (Aktivitätszunahme der 3 $\beta$ -HSD, Verschiebung zu aktiven Cortisolmetaboliten). Dies war aufgrund der fetalen Physiologie (insbesondere Mangel an 3 $\beta$ -HSD) nicht zu vermuten. Die Funktionsfähigkeit der Steroidbiosynthese bei unreifen Frühgeborenen konnte in dieser Arbeit erstmals an-

hand der relativen Enzymaktivitäten durch nicht invasive Messung der Glucocorticoidmetabolite im Urin gezeigt werden.

## 7) Summary

Introduction: During pregnancy, fetal adrenal cortex and maternal placenta form a functional unit producing fetal steroid hormones. The synthesis of these hormones is essential for maturation of fetal organ systems and intrauterine homeostasis. Immaturity of the steroid secreting system is thought to be the cause of adrenal insufficiency in premature infants. Due to the absent activity of one of its key enzymes, 3 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase, the fetus is dependent on maternal progesterone as a basis of glucocorticoid and mineralcorticoid synthesis. Furthermore 17 $\alpha$ -hydroxylase, 21-hydroxylase and 11 $\beta$ -hydroxylase are part of cortisol synthesis. 21-hydroxylase deficiency results in adrenogenital syndrome. 11 $\beta$ -hydroxylase catalyzes the last step of cortisol production. To protect the fetus from catabolic effects of cortisol, the latter is transformed by type II 11 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase into biologically inactive cortisone. Additionally cortisol is an important inhibitor of ACTH-secretion, thus preventing overproduction of androgens in the androgen-sensitive period of sexual development. These finely tuned fetoplacental interactions are interrupted quite suddenly in case of premature delivery.

Aims of investigation: Characterization of postnatal course of enzyme activity in above mentioned steroidogenic pathways by calculating precursor-product-ratios of urine metabolites, grouped by gestational age and neonatal morbidity.

Methods: In a total of 140 premature infants between gestational weeks 23 and 36 up to the second month after birth these steroid metabolites were determined by means of gas chromatography-mass spectrometry in 24-hour collected urine. Subsequently validated quotients (precursor/product) were formed which behave inversely proportional to enzyme activity. The activity of 11 $\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase was determined by division of cortisol- and cortisone-metabolites. Based on clinical criteria and the application of the "Score for Neonatal Acute Physiology" the infants were classified as being ill ("ill"), or minimally impaired ("well") prematures. The

course of enzyme activity as a function of gestational age and disease has been studied by applying statistical tests (modified multifactorial variance analysis).

Results: Infants classified ill were significantly less mature, had lower weight at birth and on average their 5 minutes APGAR Score was reduced by one. Neonatal diseases were more frequent in the “ill” infant group, coinciding with initial categorisation.

In our study, severity of illness has no significant influence on enzyme activity.

There was no difference in 17 $\alpha$ -Hydroxylase activity between patients < or > 30 weeks gestational age and no significant change during the postnatal course.

Increase in 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-activity in preterms < 30 weeks gestational age showed a significant increase from day three to week 3 ( $p < 0.019$ ) that was not found in more mature preterms > 30 weeks.

For calculation of 21 Hydroxylase activity from substrate-product-ratios, literature search yielded three validated formulas. In preterm infants < 30 weeks gestational age we found a significant decline in enzyme activity from day 3 to week 3 ( $p < 0.001$ ).

11 $\beta$ -Hydroxylase activity was significantly lower in preterm infants < 30 weeks of gestation compared to more mature preterms ( $p < 0.005$ ).

11 $\beta$ -HSD activity index is in contrast to the other activity indices, positively correlated with active cortisol metabolite, which are physiologically inactivated by 11 $\beta$ -HSD. This index was significantly higher in the group < 30 weeks on days two and three, compared to more mature preterm infants.

Conclusion: We found a significant decline in activity of key enzyme of cortisol biosynthesis parallel to declining severity of illness. This was most in preterm infants < 30 weeks. In these patients, we found significantly higher cortisol production rates, compared to the more mature group. These observations lead to the conclusion, that, in contrast to preceeding speculations, especially preterm infants < 30 weeks gestational age with higher perinatal morbidity can rely on fully functional cortisol biosynthesis. This was not to be expected from extrapolations of intrauterine fetomaternal steroidsynthesis and lack of 3 $\beta$ -HSD in utero.

This is the first work to our knowledge to demonstrate comparable functionality in steroidsynthesis in preterm infants non-invasively, using enzyme activities calculated from urine metabolom analysis.



## **Anhang:**

### **1) Harnsteroiden bei Frühgeborenen und Neonaten**

<b>Trivialnamen</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Systematische Bezeichnung</b>
<i>Cortisol-Metaboliten (Adultzone):</i>		
Tetrahydrocortisol	THF	5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-tetrol-20-on
Allo-Tetrahydrocortisol	aTHF	5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-tetrol-20-on
Tetrahydrocortison	THE	5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-triol-11,20-dion
1 $\beta$ -OH-Tetrahydrocortison	1 $\beta$ -OH-TE	5 $\beta$ -pregnan-1 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-tetrol-11,20 dion
6 $\alpha$ -OH-Tetrahydrocortison	6 $\alpha$ -OH-THE	5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-tetrol-11,20-dion
$\alpha$ -Cortolon	$\alpha$ -CL	5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ ,21-tetrol-11-on
6 $\alpha$ -OH- $\alpha$ -Cortolon	6 $\alpha$ -OH- $\alpha$ -CL	5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ ,21-pentol-11-on
$\beta$ -Cortolon	$\beta$ -CL	5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-tetrol-11-on
1 $\beta$ -OH- $\beta$ -Cortolon	1 $\beta$ -OH- $\beta$ -CL	5 $\beta$ -pregnan-1 $\beta$ ,3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-pentol-11-on
6 $\alpha$ -OH- $\beta$ -Cortolon	6 $\alpha$ -OH- $\beta$ -CL	5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-pentol-11-on
<i>Mineralocorticoidmetaboliten (Adultzone):</i>		
Tetrahydro-11-dehydro-Corticosteron	THA	5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,21-diol-11,20-dion
<i>3<math>\beta</math>-hydroxy-5-en-Steroide (Fötalzone):</i>		
5-Androsten-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol	A <sup>5</sup> -3 $\beta$ ,17 $\alpha$	5-androsten-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol
16 $\alpha$ -OH-Dehydroepiandrosteron	16 $\alpha$ -OH-DHEA	5-androsten-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diol-17-on
16 $\beta$ -OH-Dehydroepiandrosteron	16 $\beta$ -OH-DHEA	5-androsten-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diol-17-on
Androstentriol-16 $\alpha$	A <sup>5</sup> T-16 $\alpha$	5-androsten-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ -triol
Androstentriol-16 $\beta$	A <sup>5</sup> T-16 $\beta$	5-androsten-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,17 $\beta$ -triol
15 $\beta$ ,16 $\alpha$ -OH-Dehydroepiandrosteron	15 $\beta$ ,16 $\alpha$ -OH-DHEA	5-androsten-3 $\beta$ ,15 $\beta$ ,16 $\alpha$ -triol-17-on
16-O-Androstendiol	16-O-A <sup>5</sup> D	5-androsten-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol-16-on
16 $\alpha$ ,18-OH-Dehydroepiandrosteron	16 $\alpha$ ,18-OH-DHEA	5-androsten-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,18-triol-17-on
15 $\beta$ ,17 $\alpha$ -OH-Pregnenolon	15 $\beta$ ,17 $\alpha$ -OH-P <sup>5</sup> -olon	5-pregnen-3 $\beta$ ,15 $\beta$ ,17 $\alpha$ -triol-20-on
16 $\alpha$ -OH-Pregnenolon	16 $\alpha$ -OH-P <sup>5</sup> -olon	5-pregnen-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diol-20-on

Androstentetrole	A <sup>5</sup> -tetrole	5-androsten-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ ,18-tetrol
		5-androsten-3 $\beta$ ,16 $\alpha$ ,17 $\beta$ ,18-tetrol
15 $\beta$ -OH-Pregnenetetrol	15 $\beta$ -OH-P <sup>5</sup> -tetrol	5-pregnen-3 $\beta$ ,15 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -tetrol
21-OH-Pregnenolon	21-OH-P <sup>5</sup> -olon	5-pregnen-3 $\beta$ ,21-diol-20-on
3 $\beta$ ,20 $\alpha$ ,21-Pregnenetriol	P <sup>5</sup> -3 $\beta$ ,20 $\alpha$ ,21-triol	5-pregnen-3 $\beta$ ,20 $\alpha$ ,21-triol

## 2) Formeln zur Berechnung der Enzymaktivität

### 17 $\alpha$ -Hydroxylase:

16-OHP<sup>5</sup>olon / 16 $\alpha$ -OH-DHEA

### 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase:

DHEA x 100 / THE +  $\alpha$ CL +  $\beta$ CL

### 11 $\beta$ -Hydroxylase:

THS x 100 / THE +  $\alpha$ CL +  $\beta$ CL

### 21-Hydroxylase:

Formel 1: 15 $\beta$ -OH-Po x 100 / THE +  $\alpha$ CL +  $\beta$ CL

Formel 2: PO-5 $\beta$ -3 $\alpha$  x 100 / THE +  $\alpha$ CL +  $\beta$ CL

Formel 3: PT x 100 / THE +  $\alpha$ CL +  $\beta$ CL

### 11 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase:

$\Sigma$ Cortisolmetabolite /  $\Sigma$ Cortisonmetabolite

## 3) Verzeichnis der im Text vorkommenden Abkürzungen

NNR – Nebennierenrinde  
SSW – Schwangerschaftswoche  
NG – (Reifes) Neugeborenes  
FG – Frühgeborenes  
RDS – Respiratory distress syndrome  
GC-MS – Gaschromatographie-Massenspektrometrie  
FiO<sub>2</sub> – Sauerstoffanteil in der Atemluft  
tcSO<sub>2</sub> – Transkutane Sauerstoffsättigung  
BE – Base excess  
RR – Arterieller Blutdruck n. Riva Rocci  
HF – Herzfrequenz  
AF – Atemfrequenz  
pO<sub>2</sub> – Sauerstoffpartialdruck  
pCO<sub>2</sub> – Kohlendioxidpartialdruck  
Hk – Hämatokrit  
OI – Oxygenierungsindex  
AGS – Adrenogenitales Syndrom

SGA – Small for gestational age  
 BPD – Bronchopulmonale Dysplasie  
 CLD – Chronic lung disease  
 ANS – Atemnotsyndrom  
 PDA – Persistierender Ductus arteriosus  
 NEC – Nekrotisierende Enterocolitis  
 ROP – Retinopathy of prematurity  
 IVH – Intraventrikuläre Hämorrhagie

#### 4) Zusammenfassung der dreifaktoriellen Varianzanalyse

Enzym	p Gruppe	p SSW	p Gruppe / SSW	p Zeit- punkt	p Zeit- punkt / Gruppe	p Zeitpunkt / SSW	p Zeitpunkt / SSW / Gruppe
17HYD	0,142	0,142	0,142	0,142	0,142	0,142	0,142
3BHSD	0,482	0,728	0,638	0,352	0,515	0,704	0,647
21HYD Formel 1	0,554	0,209	0,768	<b>&lt; 0,001</b>	0,902	<b>0,007</b>	0,634
21HYD Formel 2	0,471	0,527	0,698	0,359	0,940	0,022	0,267
21HYD Formel 3	0,547	0,932	0,716	0,633	0,905	0,071	0,339
11BHSD	0,972	0,017	0,819	0,415	0,669	0,564	0,585
11BHSD	0,672	0,013	0,619	<b>0,004</b>	0,714	0,014	0,603

#### 4) Elterninformation

##### **Elterninformation zur Studie „Ontogenese und krankheitsbedingte Modulation der Urinsteroidexkretion bei Frühgeborenen“**

Liebe Eltern,

die Nebenniere ist ein kleines aber sehr wichtiges Organ. Sie produziert das lebenswichtige Hormon Cortisol. Cortisol braucht unser Körper, um mit Streß durch Krankheit oder Operation fertig zu werden. Ein Mangel an Cortisol im Streß kann sogar lebensgefährlich sein. In der Medizin herrscht zur Zeit Unsicherheit darüber, ob Frühgeborene ausreichend Cortisol im Streß produzieren. Zusätzlich erfährt die Nebenniere in den ersten Lebensmonaten einen erheblichen Umbau, der sie auf ihre Funktionen für das Leben außerhalb der Mutter vorbereitet. Auch dieser Prozeß ist vor allem beim Frühgeborenen nicht endgültig untersucht.

Uns stehen heute moderne Methoden zur Verfügung, die Funktion der Nebenniere im Urin sehr genau zu messen. Wir hoffen damit Klarheit in die erwähnten Fragen zu bringen und vor allem die Kinder herauszufinden, die bei Streß zu wenig Cortisol produzieren. Dazu benötigen wir nur die Windeln Ihres Kindes, aus denen wir den Urin gewinnen können. Ihrem Kind entstehen also aus dieser Untersuchung keinerlei Belastungen.

Um schnell herauszufinden, ob ein Frühgeborenes zu wenig Cortisol produziert, wäre eine Messung aus dem Blut praktisch. Wir wissen jedoch nicht, ob dies den Ausscheidungsraten im Urin entspricht. Dafür wollen wir an 4 Tagen Cortisol auch im Blut messen. Diese Untersuchungen aus einer sehr geringen Menge Blut werden immer mit einer sowieso nötigen Routineblutentnahme kombiniert, um ihrem Kind eine Blutentnahme nur für eine Studie zu ersparen. In vielen Fällen kann das Blut über einen schon liegenden Katheter schmerzfrei gewonnen werden. Der Blutverlust ist gering und beträgt maximal 1,6 ml.

Sämtliche Untersuchungen erfolgen anonym. Wann immer Sie Bedenken oder Fragen haben, sprechen Sie uns an. Sie können das heute gegebene Einverständnis auch jederzeit zurückziehen, ohne daß Ihrem Kind dadurch ein Nachteil entsteht.

Dr. M. Heckmann

Prof. Dr. L. Gortner

## 5) Einverständniserklärung

### **EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG ZUR STUDIE "Ontogenese und krankheitsbedingte Modulation der Urinsteroid- exkretion bei Früh- und Neugeborenen"**

Name:..... Vorname:.....

Geburtsdatum:.....

Ich bin damit einverstanden, dass mein Kind

1) an der Urinsammelstudie teilnimmt: ja } nein }.

2) an der Cortisolbestimmung im Blut teilnimmt: ja } nein }.

Ich bin schriftlich und mündlich aufgeklärt worden über ihr Ziel, die praktische Durchführung, den zu erwartenden Nutzen, die möglichen Risiken und die mit ihr verbundenen Belastungen.

Ich bin berechtigt, jederzeit ohne Nachteile oder Angabe von Gründen aus der Studie auszuscheiden.

Ich bin darüber informiert worden, daß die erhaltenen Daten den Bestimmungen des Datenschutzgesetzes unterliegen. Ich stimme ihrer Veröffentlichung unter der Voraussetzung zu, daß jeder Bezug zu meiner Person unkenntlich gemacht ist.

Ich bin damit einverstanden, daß die im Rahmen der Studie erhobenen Daten aufgezeichnet, von einem zur Verschwiegenheit verpflichteten Mitarbeiter oder Beauftragten der fördernden Einrichtung eingesehen bzw. abgefragt und in anonymisierter Form an die zuständige Überwachungsbehörde oder die zuständige Bundesoberbehörde weitergegeben, wissenschaftlich ausgewertet und den gesetzlichen Bestimmungen entsprechend archiviert werden. Mir ist außerdem bekannt, daß in seltenen Ausnahmefällen und nur unter Wahrung meiner Persönlichkeitsrechte eine Weitergabe nicht anonymisierter Daten erforderlich sein kann.

Ich konnte Fragen stellen. Sie wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich habe keine weiteren Fragen mehr.

Ich habe eine Kopie der schriftlichen Aufklärung und dieser Einverständniserklärung erhalten.

Ort/Datum .....

Unterschrift des Patienten / Zeugen / Probanden  
.....

Unterschrift des Studienleiters .....  
bzw. seines Stellvertreters

## Literaturverzeichnis:

1. K. Fleischhauer, P.G., *Endokrine Drüsen*. aus Benninghoff (Hrsg.): Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, 1994. **Band 2**: p. 200 -208.
2. Crowder, R.E., *The development of the adrenal gland in man, with special reference to origin and ultimate location of cell types and evidence in favor of the cell migration theory*. Contrib. Embryol. Carnegie Inst., 1957(36): p. 193-209.
3. Merke, D.P. and C.A. Stratakis, *The adrenal life cycle: the fetal and adult cortex and the remaining questions*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2006. **19**(11): p. 1299-302.
4. Neville, A.M., M.J. O'Hare, *The Human Adrenal Cortex*. Springer, Berlin - Heidelberg - New York, 1982.
5. Sucheston, M.E. and M.S. Cannon, *Development of zonular patterns in the human adrenal gland*. J Morphol, 1968. **126**(4): p. 477-91.
6. Parker CR, F.-P.O., Stankovic AK, Mason JI, Grizzle WE, *Immunohistochemical evaluation of the cellular localization and ontogeny of 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/D5-4 isomerase in the human fetal adrenal gland*. Endocr Res, 1995. **21**: p. 69-80.
7. Voutilainen R, I.V., Miettinen P, *Low expression of 3 $\beta$ -hydroxy-5-ene steroid dehydrogenase gene in human fetal adrenals in vivo; adrenocorticotropin and protein kinase C-dependent regulation in adrenocortical cultures*. J Clin Endocrinol Metab, 1991. **72**: p. 761-767.
8. Mesiano, S. and R.B. Jaffe, *Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex*. Endocr Rev, 1997. **18**(3): p. 378-403.
9. Hingre, R.V., S.J. Gross, K.S. Hingre et al., *Adrenal steroidogenesis in very low birth weight preterm infants*. J Clin Endocrinol Metab, 1994. **78**(2): p. 266-70.
10. Diczfalussy, E., *Steroid metabolism in the human foeto-placental unit*. Acta Endocrinol (Copenh), 1969. **61**(4): p. 649-64.
11. Peter, M., H.G. Dorr, and W.G. Sippell, *Changes in the concentrations of dehydroepiandrosterone sulfate and estriol in maternal plasma during pregnancy: a longitudinal study in healthy women throughout gestation and at term*. Horm Res, 1994. **42**(6): p. 278-81.
12. Seron-Ferre, M., C.C. Lawrence, P.K. Siiteri et al., *Steroid production by definitive and fetal zones of the human fetal adrenal gland*. J Clin Endocrinol Metab, 1978. **47**(3): p. 603-9.
13. Goto, M., K. Piper Hanley, J. Marcos et al., *In humans, early cortisol biosynthesis provides a mechanism to safeguard female sexual development*. J Clin Invest, 2006. **116**(4): p. 953-60.
14. Edwards, H.E. and W.M. Burnham, *The impact of corticosteroids on the developing animal*. Pediatr Res, 2001. **50**(4): p. 433-40.
15. Pasqualini, J.R., J. Marfil, F. Garnier et al., *Studies on the metabolism of corticosteroids in the human foeto-placental unit. 4. Metabolism of deoxycorticosterone and corticosterone administered simultaneously into the intact umbilical circulation*. Acta Endocrinol (Copenh), 1970. **64**(3): p. 385-97.
16. Bolt, R.J., M.M. van Weissenbruch, H.N. Lafeber et al., *Development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the fetus and preterm infant*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2002. **15**(6): p. 759-69.
17. de Peretti, E. and M.G. Forest, *Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in humans from birth to adulthood: evidence for testicular production*. J Clin Endocrinol Metab, 1978. **47**(3): p. 572-7.
18. Sperling, M., *Newborn adaption: adrenocortical hormones and ACTH*. in: Tulchinsky D, Little AB (Hrsg.): Maternal-fetal endocrinology, 1994. **Saunders, Philadelphia**: p. 420-442.
19. Sasaki, A., O. Shinkawa, A.N. Margioris et al., *Immunoreactive corticotropin-releasing hormone in human plasma during pregnancy, labor, and delivery*. J Clin Endocrinol Metab, 1987. **64**(2): p. 224-9.

20. Pohjavuori, M. and F. Fyhrquist, *Vasopressin, ACTH and neonatal haemodynamics*. Acta Paediatr Scand Suppl, 1983. **305**: p. 79-83.
21. Sippell, W.G., H. Becker, H.T. Versmold et al., *Longitudinal studies of plasma aldosterone, corticosterone, deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, cortisol, and cortisone determined simultaneously in mother and child at birth and during the early neonatal period. I. Spontaneous delivery*. J Clin Endocrinol Metab, 1978. **46**(6): p. 971-85.
22. Vermes, I., J. Dohanics, G. Toth et al., *Maturation of the circadian rhythm of the adrenocortical functions in human neonates and infants*. Horm Res, 1980. **12**(5): p. 237-44.
23. Mastorakos, G. and I. Ilias, *Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **997**: p. 136-49.
24. Scott, S.M. and K.L. Watterberg, *Effect of gestational age, postnatal age, and illness on plasma cortisol concentrations in premature infants*. Pediatr Res, 1995. **37**(1): p. 112-6.
25. Heckmann, M., M.F. Hartmann, B. Kampschulte et al., *Cortisol production rates in preterm infants in relation to growth and illness: a noninvasive prospective study using gas chromatography-mass spectrometry*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(10): p. 5737-42.
26. Heckmann, M. and S.A. Wudy, *[Adrenal function in very preterm infants in the early postnatal period]*. Klin Padiatr, 2001. **213**(6): p. 307-13.
27. Watterberg, K.L., *Adrenocortical function and dysfunction in the fetus and neonate*. Semin Neonatol, 2004. **9**(1): p. 13-21.
28. Helbock, H.J., R.M. Insoft, and F.A. Conte, *Glucocorticoid-responsive hypotension in extremely low birth weight newborns*. Pediatrics, 1993. **92**(5): p. 715-7.
29. Economou, G., S. Andronikou, A. Challa et al., *Cortisol secretion in stressed babies during the neonatal period*. Horm Res, 1993. **40**(5-6): p. 217-21.
30. Gunes, T., E. Koklu, M.A. Ozturk et al., *Evaluation of serum cortisol levels in a relatively large and mature group of ventilated and nonventilated preterm infants with respiratory distress syndrome*. Am J Perinatol, 2006. **23**(6): p. 335-9.
31. Grofer, B., R.H. Bodeker, L. Gortner et al., *Maturation of Adrenal Function Determined by Urinary Glucocorticoid Steroid Excretion Rates in Preterm Infants of More than 30 Weeks of Gestational Age*. Neonatology, 2010. **98**(2): p. 200-205.
32. Heckmann, M., M.F. Hartmann, B. Kampschulte et al., *Persistent high activity of the fetal adrenal cortex in preterm infants: is there a clinical significance?* J Pediatr Endocrinol Metab, 2006. **19**(11): p. 1303-12.
33. Midgley, P.C., K. Russell, N. Oates et al., *Activity of the adrenal fetal zone in preterm infants continues to term*. Endocr Res, 1996. **22**(4): p. 729-33.
34. Heckmann, M., M.F. Hartmann, B. Kampschulte et al., *Assessing cortisol production in preterm infants: do not dispose of the nappies*. Pediatr Res, 2005. **57**(3): p. 412-8.
35. Caulfield, M.P., T. Lynn, M.E. Gottschalk et al., *The diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in the newborn by gas chromatography/mass spectrometry analysis of random urine specimens*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(8): p. 3682-90.
36. Ballard, J.L., J.C. Khoury, K. Wedig et al., *New Ballard Score, expanded to include extremely premature infants*. J Pediatr, 1991. **119**(3): p. 417-23.
37. Heckmann, M., S.A. Wudy, D. Haack et al., *Reference range for serum cortisol in well preterm infants*. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 1999. **81**(3): p. F171-4.
38. Heckmann, M., S.A. Wudy, D. Haack et al., *Serum cortisol concentrations in ill preterm infants less than 30 weeks gestational age*. Acta Paediatr, 2000. **89**(9): p. 1098-103.
39. Richardson, D.K., J.E. Gray, M.C. McCormick et al., *Score for Neonatal Acute Physiology: a physiologic severity index for neonatal intensive care*. Pediatrics, 1993. **91**(3): p. 617-23.
40. Roberts, S.B. and A. Lucas, *Measurement of urinary constituents and output using disposable napkins*. Arch Dis Child, 1985. **60**(11): p. 1021-4.
41. Ahmad, T., D. Vickers, S. Campbell et al., *Urine collection from disposable nappies*. Lancet, 1991. **338**(8768): p. 674-6.
42. Taylor, N., S. Sharma, F. Giffin et al., *Urinary excretion of adrenocortical steroid metabolites by pre-term human infants: trends from birth until 3 months post term*. Endocr Res, 1996. **22**(4): p. 741-9.

43. Honour, J.W., J. Kent, and C.H. Shackleton, *Improved recoveries in the extraction of steroids from neonatal urine*. Clin Chim Acta, 1983. **129**(2): p. 229-32.
44. Wudy SA, H.J., Teller WM, *Clinical steroid analysis by gas chromatography-mass spectrometry*. In: Niessen WMA (Hrsg.): Current practice of gas chromatography-mass spectrometry, 2001. **Marcel Dekker, Inc. New York**: p. 309-339.
45. Nykanen, P., K. Heinonen, F.G. Riepe et al., *Serum concentrations of adrenal steroids and their precursors as a measure of maturity of adrenocortical function in very premature newborns*. Horm Res Paediatr, 2010. **74**(5): p. 358-64.
46. Taylor, N.F., D.H. Curnow, and C.H. Shackleton, *Analysis of glucocorticoid metabolites in the neonatal period: catabolism of cortisone acetate by an infant with 21-hydroxylase deficiency*. Clin Chim Acta, 1978. **85**(3): p. 219-29.
47. Shackleton, C.H., J.W. Honour, and N.F. Taylor, *Metabolism of fetal and neonatal adrenal steroids*. J Steroid Biochem, 1979. **11**(1B): p. 523-9.
48. (DGGG) Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe  
Board für Pränatal- und Geburtsmedizin, D.G.f.P.M.D., *Antenatale Kortikosteroide zur Lungenreifung (ACS)*  
AWMF Leitlinien, 2009.
49. Volpe, J., *Neurology of the newborn*. 1995. **Philadelphia: WB Saunders** p. 314-369.
50. Papile, L.A., J. Burstein, R. Burstein et al., *Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm*. J Pediatr, 1978. **92**(4): p. 529-34.
51. Vodovar, M., M. Voyer, C. Belloy et al., *[Bronchopulmonary dysplasia]*. Ann Pediatr (Paris), 1983. **30**(5): p. 369-78.
52. Shennan, A.T., M.S. Dunn, A. Ohlsson et al., *Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period*. Pediatrics, 1988. **82**(4): p. 527-32.
53. Giedion, A., H. Haefliger, and P. Dangel, *Acute pulmonary X-ray changes in hyaline membrane disease treated with artificial ventilation and positive end-expiratory pressure (PEP)*. Pediatr Radiol, 1973. **1**(3): p. 145-52.
54. Veith, J. and J.E. Scharre, *Retinopathy of prematurity--review of the pathophysiology and classification*. J Am Optom Assoc, 1992. **63**(7): p. 496-9.
55. Bell, M.J., *Neonatal necrotizing enterocolitis*. N Engl J Med, 1978. **298**(5): p. 281-2.
56. Lee, M.M., L. Rajagopalan, G.J. Berg et al., *Serum adrenal steroid concentrations in premature infants*. J Clin Endocrinol Metab, 1989. **69**(6): p. 1133-6.
57. Wittekind, C.A., J.D. Arnold, G.I. Leslie et al., *Longitudinal study of plasma ACTH and cortisol in very low birth weight infants in the first 8 weeks of life*. Early Hum Dev, 1993. **33**(3): p. 191-200.
58. Richardson, D.K., C.S. Phibbs, J.E. Gray et al., *Birth weight and illness severity: independent predictors of neonatal mortality*. Pediatrics, 1993. **91**(5): p. 969-75.
59. Doerr, H.G., W.G. Sippell, H.T. Versmold et al., *Plasma mineralocorticoids, glucocorticoids, and progestins in premature infants: longitudinal study during the first week of life*. Pediatr Res, 1988. **23**(5): p. 525-9.
60. Heckmann M, H.M., Kampschulte B, Grofer B, Wudy SA, *Plasmasteroideinzelmessungen repräsentieren nicht die Cortisolproduktionsraten bei Frühgeborenen: Eine Studie mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (Abstract)*. Z Geburtshilfe Neonatol, 2006(210): p. 31.
61. Zumoff, B., D.K. Fukushima, and L. Hellman, *Intercomparison of four methods for measuring cortisol production*. J Clin Endocrinol Metab, 1974. **38**(2): p. 169-75.
62. Kraan, G.P., R.P. Dullaart, J.J. Pratt et al., *The daily cortisol production reinvestigated in healthy men. The serum and urinary cortisol production rates are not significantly different*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(4): p. 1247-52.
63. Li, H., J. Qiao, and H. Guo, *17-alpha-hydroxylase deficiency: a case report with clinical and molecular analysis*. Gynecol Endocrinol, 2010. **26**(7): p. 521-3.
64. Dean, H.J., C.H. Shackleton, and J.S. Winter, *Diagnosis and natural history of 17-hydroxylase deficiency in a newborn male*. J Clin Endocrinol Metab, 1984. **59**(3): p. 513-20.



65. Jadot, O., G. Thiry, and F. Bury, [Case report: congenital adrenal hyperplasia and ambiguous genitalia due to 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency]. *Rev Med Liege*, 2004. **59**(9): p. 485-8.
66. Wolthers, B.G., I.J. de Vries, M. Volmer et al., *Detection of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency in a newborn by means of urinary steroid analysis*. *Clin Chim Acta*, 1987. **169**(1): p. 109-16.
67. Parker, C.R., Jr., O. Faye-Petersen, A.K. Stankovic et al., *Immunohistochemical evaluation of the cellular localization and ontogeny of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-4 isomerase in the human fetal adrenal gland*. *Endocr Res*, 1995. **21**(1-2): p. 69-80.
68. Doody, K.M., B.R. Carr, W.E. Rainey et al., *3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase in the fetal zone and neocortex of the human fetal adrenal gland*. *Endocrinology*, 1990. **126**(5): p. 2487-92.
69. White, P.C. and P.W. Speiser, *Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. *Endocr Rev*, 2000. **21**(3): p. 245-91.
70. Shackleton, C.H., *Congenital adrenal hyperplasia caused by defect in steroid 21-hydroxylase. Establishment of definitive urinary steroid excretion pattern during first weeks of life*. *Clin Chim Acta*, 1976. **67**(3): p. 287-98.
71. Khemiri, M., H. Ridane, Y.O. Bou et al., [11 beta hydroxylase deficiency: a clinical study of seven cases]. *Tunis Med*, 2006. **84**(2): p. 106-13.
72. Burren, C.P., J. Montalto, A.B. Yong et al., *CYP11 beta 1 (11-beta-hydroxylase) deficiency in congenital adrenal hyperplasia*. *J Paediatr Child Health*, 1996. **32**(5): p. 433-8.
73. Beitins, I.Z., F. Bayard, I.G. Ances et al., *The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term*. *Pediatr Res*, 1973. **7**(5): p. 509-19.
74. Gitau, R., N.M. Fisk, J.M. Teixeira et al., *Fetal hypothalamic-pituitary-adrenal stress responses to invasive procedures are independent of maternal responses*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001. **86**(1): p. 104-9.
75. Nahoul, K., F. Daffos, F. Forestier et al., *Plasma corticosteroid patterns in the fetus*. *J Steroid Biochem*, 1988. **29**(6): p. 635-40.
76. Vogeser, M., T.W. Felbinger, W. Roll et al., *Cortisol metabolism in the postoperative period after cardiac surgery*. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1999. **107**(8): p. 539-46.

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich all denjenigen danken, die mich bei der Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit unterstützt und gefördert haben.

An erster Stelle möchte ich PD Dr. M. Heckmann zur Überlassung des Themas, für die vorbildliche Unterstützung, für die konstruktiven Hinweise und den nimmermüden Optimismus danken. Ohne ihn wäre die Arbeit nicht zustande gekommen.

Außerdem danke ich allen Ärzten und Schwestern auf den neonatologischen Stationen, die bei der Sammlung der Daten geholfen haben. Prof. Dr. S. Wudy danke ich für die Messung der Urinproben in dessen Steroidforschungslabor.

Für die statistische Beratung und Bearbeitung der Daten danke ich Dr. R.-H. Bödeker und Fr. C. Scheibelhut aus der Arbeitsgruppe Medizinische Statistik.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern, Großeltern und meinem Bruder. Ohne deren jahrelanger Begleitung und Unterstützung wären meine Ausbildung und diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Dank gilt auch meinen Freunden und besonders auch Dir, Kyra, für alles was Du bist. Du hast mich in den letzten elf Jahren begleitet, danke dafür.

Ich widme die Arbeit meiner Tochter Frida Linn.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5986-6

